

Entwicklung und Charakterisierung einer fermentativen Oxidation von Butan im Blasensäulenreaktor

**Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von

Gerrit Sluyter

aus

Münster

2019

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Michael Schlüter

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c. Stefan Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2018

Abstract

Butane is an abundant side product of oil and gas production. Today it is mostly burned for energy and heat production. The chemical syntheses require high temperatures and pressures and is less selective. The biocatalytic reaction offers a selective way to convert butane to value products under low temperature and pressure. The *Alkane-BGT Monoxygenase* enzyme system expressed in *E. coli* offers a robust and fast model system for the microbial butane oxidation in lab scale. At first the transport limited process is established in a 2-liter bubble column with control system and under safety requirements obligatory when working with butane-air mixtures. Further, the process is characterized regarding the relevant process parameters gassing rate, temperature, pressure and butane content. The transferability of the process via the k_{La} value is demonstrated. The determined optimum could be validated and volumetric productivities of up to $9.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ could be reached. The scale up potential is discussed as a first step to an industrial oxidation of butane.

Kurzzusammenfassung

Butan fällt als Nebenprodukt bei der Raffinierung von Erdöl an und wird größtenteils zur Energie- und Wärmegewinnung verfeuert. Das in *E. coli* exprimierte Alkane-BGT-Monoxygenase Enzymsystem ist dabei ein robustes Modellsystem mit hoher Butanaufnahmerate, um die fermentative Oxidation unter moderaten Prozessbedingungen zu betreiben. Das Hauptziel der Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung der fermentativen Oxidation von Butan im Blasensäulenreaktor. Reaktor (2 L) und Prozessleitsystem wurden ausgelegt und konstruiert, wobei Sicherheitsaspekte in der Handhabung von Butan-Luft-Gemischen im Vordergrund standen. Die relevanten Prozessparameter Begasungsrate, Druck, Temperatur und Butangehalt wurden variiert und der Einfluss auf die Zielgrößen volumetrische Produktivität und Ausbeute bestimmt. Dabei wurde die Zellaktivität in den Experimenten hinreichend hoch gewählt, sodass der Butaneintrag ins Medium stets limitierend war. Die Begasungsrate wurde dabei zwischen $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,125 vvm) und $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,75 vvm), die Temperatur zwischen $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, der Druck zwischen 1,1 bar (a) und 1,5 bar (a) und der Butangehalt zwischen 14 % v/v und 28 % v/v variiert. Im betrachteten Prozessfenster stieg die volumetrische Produktivität mit der Begasungsrate um 290 %, mit zunehmender Temperatur um 270 % und durch die Erhöhung des Druckes konnte ein Anstieg der volumetrischen Produktivität von 160 % erreicht werden.

Mit den gemessenen k_{La} -Werten ergibt sich für die Prozessparameter Begasungsrate, Druck und Temperatur eine Übertragbarkeit zu dem mit der volumetrischen Produktivität berechneten k_{La} -Wert mit einem Übertragungsfehler bei unter $\pm 5 \text{ h}^{-1}$. Die Erhöhung des Butananteils resultierte in einer marginalen Erhöhung der Produktivität. Hier bedarf es weiterer Validierung, jedoch bringt die Erhöhung dieses Prozessparameters nicht die erwartete Produktivitätszunahme. Mit den Trends der Charakterisierung wurde eine Berechnungsvorschrift für die volumetrische Produktivität anhand der Prozessparameter erstellt. Es erfolgte eine Validierung des Optimums im Prozessfenster mit einem relativen Fehler von $< 1 \%$. Dabei konnte eine volumetrische Produktivität von $9,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreicht werden bei einer Ausbeute von $2,7 \%$. Um eine erste Abschätzung für eine Skalierung zu ermöglichen, wurde das Prozessvolumen um 150% , bei gleichem Innendurchmesser, auf 5 L erhöht ($H/D = 12$). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Erhöhung der Verweilzeit der Gasblasen eine Erhöhung der Ausbeute um 82% auf über 5% erreicht werden konnte. Eine erste theoretische Abschätzung hin zu Blasensäulenhöhen von 20 Metern mit 3 bar am Säulenboden zeigte, dass auch im idealisierten Fall für hohe Ausbeuten bei industriell relevanter volumetrischer Produktivität eine Rezyklierung des Butans notwendig wird. Deshalb wurde ein angepasstes Reaktorkonzept für den Labormaßstab vorgeschlagen, bei dem neben einem Umstieg zu einem Rührkesselreaktor zudem eine Butanrückführung installiert ist. Die in dieser Arbeit gewonnenen Charakterisierungsdaten und Validierungen, die Übertragbarkeit mittels k_{La} -Messung und das vorgeschlagene Reaktorkonzept bilden dabei die Basis für eine Etablierung der fermentativen Butanoxidation im Industriemaßstab

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation.....	13
2	Zielsetzung.....	15
3	Stand der Technik.....	16
4	Theorie	22
4.1	Blasensäulenreaktoren	22
4.1.1	Löslichkeit, k_{La} -Wert und Stofftransport.....	23
4.1.2	Beschreibung von Blasenströmungen.....	30
4.2	Reaktionssystem – fermentative Oxidation mittels AlkBGT	34
4.2.1	AlkBGT Monooxygenasensystem	35
4.2.2	Volumetrische Produktivität & Ausbeute	36
4.3	Sicherheitsaspekte im Umgang mit Butan/Luft-Gemischen	37
5	Material und Methoden.....	40
5.1	Reaktorkonzept und Konstruktion	40
5.1.1	Blasensäulenreaktor.....	40
5.1.2	Prozesskontrollsystem	42
5.1.3	Sicherheitsrelevante Einrichtungen	44
5.2	Analytik.....	47
5.2.1	Produktanalytik mittels GC.....	47
5.2.2	Zelldichtebestimmung mittel Photometer.....	47
5.2.3	Bestimmung der gelösten Glukose mittels Blutzuckermessgerät	48
5.3	Versuchsdurchführung	49
5.3.1	Zellgewinnung durch Hochzelldichtefermentation	49
5.3.2	Aktivitätstests mit Butanol	50
5.3.3	Butanoxidation in der Blasensäule.....	51
5.3.4	Variationen in der Betriebsweise der Blasensäule	54
6	Ergebnisse und Diskussion	55

6.1	Erstellung des Reaktoraufbaus	55
6.2	Butanoxidationen in der Blasensäule	57
6.2.1	Einfluss des biologischen Systems.....	59
6.2.1	Spezifische Glukosezufuhrtrate	61
6.3	Relevante Prozessparameter.....	63
6.3.1	Begasungsrate	64
6.3.2	Butananteil	67
6.3.3	Temperatur.....	71
6.3.4	Systemdruck	74
6.3.5	k_{La} -Wert und Gasgehalt	78
6.3.6	Sauerstoffkonzentration im Medium.....	80
6.4	Charakterisierung des Prozessfensters	81
6.4.1	Mischzeit	84
6.5	Abschätzung der Skalierungs-Kompatibilität	85
6.6	Übergreifende Diskussion.....	87
6.6.1	Übertragbarkeit auf Basis des k_{La} -Wert.....	87
6.6.2	Priorisierung der Prozessparameter	99
6.6.3	Skalierungsabschätzung	101
6.6.4	Prozessfenster und Prozessbewertung.....	104
7	Fehlerbetrachtung.....	113
7.1	Analytik & Probenhandhabung	113
7.2	Zellhandhabung	115
7.3	Versuchsdurchführung & Reproduzierbarkeit	116
8	Ausblick	119
9	Zusammenfassung.....	120
10	Literaturverzeichnis.....	IX
11	Anhang.....	XV

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
abs.	Absolut - bezogen auf den Druck
AlkB	Alkane Monooxygenase B
AlkBGT	Alkane-Monooxygenase Enzymsystem AlkBGT
AlkG	Rubredoxin AlkG des AlkBGT Enzymsystems
AlkT	Rebredoxin Reduktase des AlkBGT Enzymsystems
BTM	Biotrockenmasse
BTR	Butane Transfer Rate - Butantransfertrate
Bu (als Index)	Butan (Bsp.: y_{Bu} als Molenbruch bzw. Butananteil)
BuAl	Butanal / Butyraldehyd
BuCOOH	Buttersäure
BuOH	1-Butanol
BUR	Butane Uptake Rate - Butanaufnahmerate
DCKP	Dicyclopropylketon
C ₄ H ₁₀	Butan
DO	Dissolved Oxygen / Gelöstsauerstoff
GC	Gaschromatographie
MFC	Mass Flow Controller - Massendurchflussregler
OEG	Obere Explosionsgrenze
OTR	Oxygen Transfer Rate - Sauerstofftransfertrate
OUR	Oxygen Uptake Rate - Sauerstoffaufnahmerate
UEG	Untere Explosionsgrenze
v/v	Volumenanteil
vol.	Volumetrische (Produktivität)

Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
Y	[-]	Ausbeute
X	[-]	Umsatz
c_i	[mmol·L ⁻¹]	Konzentration des Stoffes i
H^{cp}	[mmol·m ⁻³ ·bar ⁻¹]	Henry-Koeffizient (stoffsystemspezifisch)
C	[K]	Temperaturabhängigkeitskonstante (Henry)
k_{La}	[h ⁻¹]	Volumenspezifischer Stoffübergangskoeffizient
p	[Pa oder bar]	Systemdruck
R	[J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	Universelle Gaskonstante
UPM	[min ⁻¹]	Umdrehungen pro Minute
T	[K oder °C]	Temperatur
T_{ref}	[K oder °C]	Referenztemperatur (Henry)
α	[-]	Korrekturfaktor zum k_{La} -Wert
y_i	[mol·mol ⁻¹]	Stoffmengenanteil i in der Gasphase
x_i	[mol·mol ⁻¹]	Stoffmengenanteil i in der Flüssigphase
P_{vol}	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Volumetrische Produktivität (gesamt)
$P_{vol}^{\check{v}}$	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Anteil Begasungsrate an vol. Produktivität
P_{vol}^T	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Anteil Temperatur an vol. Produktivität
P_{vol}^P	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Anteil Druck an vol. Produktivität
k_{Butan}	[-]	Korrekturfaktor Butangehalt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Projekt der fermentativen Oxidation von Butan im Blasensäulenreaktor	15
Abbildung 2 : Funktionsprinzip verschiedener Reaktoren für den Gas-Flüssig-Kontakt	18
Abbildung 3 : Reaktionsschema der Butanoxidation durch das AlkBGT-Enzysystem	20
Abbildung 4 : Löslichkeit von Butan und (Luft)Sauerstoff in Wasser.....	24
Abbildung 5 : Diffusionskoeffizienten für Butan und Sauerstoff in Wasser	26
Abbildung 6: Systematische Darstellung des Stofftransports von Sauerstoff und Butan	27
Abbildung 7 : Explosionsdiagramm Butan-Sauerstoff-Stickstoff	38
Abbildung 8 : Laboraufbau des 2 L Blasensäulenreaktors	40
Abbildung 9 : R&I Fließbild des Blasensäulenreaktors;.....	41
Abbildung 10 : Graphische Benutzeroberfläche für die Steuerung	43
Abbildung 11 : R&I Fließbild der Gasversorgung	45
Abbildung 12 : Aufbau des Rührkesselfermenters für die Hochzelldichtefermentation.....	49
Abbildung 13 : Schema zum zeitl. Verlauf der BuCOOH-Konzentration.....	53
Abbildung 14 : Reaktoraufbau im Laborabzug.....	56
Abbildung 15 : Beispiel einer Butanoxidation in der Blasensäule.	57
Abbildung 16 : Einfluss der Zelldichte auf die volumetrische Produktivität.....	60
Abbildung 17 : Einfluss der spez. Glukosezufuhr rate auf die volumetrische Produktivität	62
Abbildung 18 : Einfluss der spezifischen Glukosezufuhr rate auf die Ausbeute.....	63
Abbildung 19 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von der Begasungsrate.....	65
Abbildung 20 : Abhängigkeit der Ausbeute von der Begasungsrate	66
Abbildung 21 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität vom Butangehalt.....	67
Abbildung 22 : Butanoxidation mit 2 L Medium bei 30°C, 1,1 bar abs. und 0,7 L·min ⁻¹	68
Abbildung 23 : Abhängigkeit der Ausbeute vom Butangehalt.....	69
Abbildung 24 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes vom Butananteil	70
Abbildung 25 : Temperaturabhängigkeit der volumetrischen Produktivität.....	71
Abbildung 26 : Temperaturabhängigkeit der Ausbeute	72
Abbildung 27 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes von der Temperatur.	73
Abbildung 28 : Volumetrische Produktivität in Abhängigkeit des Systemdruckes	75
Abbildung 29 : Anstieg der volumetrischen Produktivität über den Partialdruck	76
Abbildung 30 : Abhängigkeit der Ausbeute vom Systemdruck.....	77
Abbildung 31 : k_{La} -Wert in Abhängigkeit von der Leerrohrgeschwindigkeit/Begasungsrate .	79

Abbildung 32 : Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration.	80
Abbildung 33 : Prozessfenster für den betrachteten Blasensäulenreaktor.....	83
Abbildung 34 : Vergleich des Ergebnisses der Berechnung auf Basis der Charakterisierung..	84
Abbildung 35 : Abhängigkeit der vol. Produktivität und der Ausbeute von der Skalierung. ...	85
Abbildung 36 : Aus der volumetrischen Produktivität berechnete k_{La} -Werte	87
Abbildung 37 : k_{La} -Wert berechnet aus vol. Produktivität in Abhängigkeit des k_{La} -Wertes... 88	
Abbildung 38 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes berechnet aus der vol. Produktivität.....	90
Abbildung 39 : Volumetrische Produktivität in Abhängigkeit der maximalen Löslichkeit.....	91
Abbildung 40 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes aus vol. Produktivität vom k_{La} -Wert	92
Abbildung 41 : Abhängigkeit des k_{La} -Wert bei $T_{ref} = 30^{\circ}C$ von der Temperatur.	93
Abbildung 42 : Gegenüberstellung des aus der vol. Produktivität berechneten k_{La} -Wertes..	95
Abbildung 43 : normalisierter Einfluss der einzelnen Prozessparameter auf den k_{La} -Wert ...	96
Abbildung 44 : Einflusses von Temperatur und Butangehalt auf den k_{La} -Wert	98
Abbildung 45 : Einfluss der Prozessparameter auf die volumetrische Produktivität	100
Abbildung 46 : Berechnung für die Approximierung der volumetrischen Produktivität.....	102
Abbildung 47 : Vereinfachte Abschätzung der fermentativen Oxidation von Butan	103
Abbildung 48 : Prozessfenster der Laborblasensäule (2 L - 1,1 bar (abs.)).....	105
Abbildung 49 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von der Ausbeute	109
Abbildung 50 : R&I - Rührkessel zur fermentativen Oxidation von Butan mit Rezyklierung.	112
Abbildung 51 : Fehlerabschätzung Probenahme und Analytik	115
Abbildung 52 : Reproduzierbarkeit bei Doppelbestimmung.	117
Abbildung 53 : Zeitlicher Verlauf der Buttersäurekonzentration	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Reaktortypen für die Fermentation	19
Tabelle 2 : Abschätzung der Oberfläche aller Gasblasen und der Oberfläche aller Zellen.....	29
Tabelle 3 : Spezifikationen für die gaschromatographische Analyse von Buttersäure	47
Tabelle 4 : Übersicht der Butanoxidation in der Blasensäule mit Prozessparametern	58
Tabelle 5 : Prozessparameter mit Min-Werten und Max-Werten.....	64

Formelverzeichnis

TXX : Theorie-Teil Formeln; **EXX** : Ergebnisteil-Formeln

T01	Maximale Löslichkeit von Gasen im wässrigen Medium
T02	Sauerstofftransferrate
T03	Butantransferrate
T04	Butantransferrate wenn BUR >> BTR
T05	Auftriebskraft an der Gasblase
T06	Widerstandskraft an der Gasblase
T07	„Stokes“-Gleichung
T08	Volumetrische Produktivität
T09	Ausbeute
E01 – E04	Teilterme der vol. Produktivität – Begasungsrate; Druck, Temperatur, Butangehalt
E05 – E06	Berechnungsvorschrift der vol. Produktivität aus der Charakterisierung
E07	Minimale Zelldichte
E08	Maximale spezifische Zellaktivität
E09	Minimale spezifische Glukosezufuhrtrate
E10	Minimal benötigte Sauerstoffkonzentration im Medium
E11 – E13	Angepasste Butantransferrate als Funktion des k_{La} -Wertes mit Temperatur und Butangehalt

1 Einleitung und Motivation

Butan fällt als Nebenprodukt bei der Raffinierung von Erdöl oder bei der Erdgasgewinnung an. Dabei kann dieser Seitenstrom innerhalb eines Chemiestandortes im Bereich mehrerer Kilotonnen pro Jahr liegen [1]. Dieses kann entweder weiter prozessiert werden, dient als Kraftstoff für Automobile oder wird oft zur Erzeugung von Wärme und Elektrizität nachgeschaltet verfeuert. Eine Umwandlung des Butans ist dabei auf klassisch chemischen Wege nur unter hohen Drücken und hohen Temperaturen möglich, kann Nebenprodukte erzeugen und ist nicht selektiv bzgl. der mittleren Oxidationsstufen [2, 3]. Die Verwendung von Biokatalysatoren erlaubt stattdessen eine selektive Reaktion unter milden Prozessbedingungen [4, 5, 6]. So sind mehrere Mikroorganismen und Enzymsysteme bekannt, die kurzkettige Alkane oxidieren können [7, 8, 9, 10, 11]. Die Herausforderung besteht bei diesen Biotransformationen im Kompromiss zwischen Produktivität, Ausbeute, mikrobiologischen Anforderungen und Prozesssicherheit. So müssen für die Oxidation sowohl das Butan als auch der Sauerstoff dem System zugeführt werden, wobei für Butan-Luft-Gemische spezifische Explosionsbereiche beachtet werden müssen. Weiter sind diese gasförmigen Substrate nur gering löslich in den typischen Puffermedien, welche wiederum Voraussetzung für die Verwendung von Mikroorganismen sind. Entsprechend oft sind Prozesse, bei denen das Substrat gasförmig vorliegt, durch den Stofftransport vom Gas ins Medium limitiert [12, 13, 14, 15, 16]. Aufgrund der Kofaktorabhängigkeit der Oxidationssysteme ist dabei die Verwendung isolierter Enzyme und kostenintensiver Kofaktoren bei der Produktion von Bulkchemikalien abzuwägen [17]. Eine Verwendung von Ganzzellkatalysatoren erlaubt die Oxidation ohne den Einsatz von isolierten Kofaktoren. Entscheidend für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses sind die volumetrische Produktivität und die Ausbeute.

Ist der Prozess durch den Stofftransport ins Medium limitiert, ist für die volumetrische Produktivität der Gas-Flüssig-Stoffübergang entscheidend. Hier sind in der Verfahrenstechnik verschiedene Reaktorkonzepte, sogenannte Gas-Flüssig-Kontaktor etabliert. Hohe Gaseinträge können mit Rührkesselreaktoren erreicht werden, wobei diese kostenintensiv in Betrieb und Investition sind. Die Blasensäule als Reaktorkonzept bietet im Vergleich zu anderen Gas-Flüssig-Kontaktoren deutlich geringe Betriebskosten, kann größere Volumina prozessieren und hat bei großer Bauhöhe lange Verweilzeiten der Gasblasen [18, 19]. Dadurch sind hohe Ausbeuten bzgl. des zugeführten Mischgasstroms möglich. Dieses hat den Vorteil,

dass keine Rezyklierung des Butan-Luft-Stromes nachgeschaltet werden muss, um hohe Ausbeuten zu erreichen. Im Hinblick auf eine Skalierung bis zum Industriemaßstab sind damit zwei Prozesse denkbar. Ein Rührkessel mit Rückführung des Gases und eine Blasensäule mit ausreichender Höhe und damit erhöhter Verweilzeit. Bei einer Rezyklierung des Butanes sind eine aufwendige Kondensation und eine Mischgasregelung nötig, um hier stets außerhalb des Explosionsbereiches zu arbeiten. Gasfermentation in Blasensäulen im Bereich der Syngasfermentation sind schon bis in den Industriemaßstab etabliert [19, 20]. Die Blasensäule erlaubt dabei einen sicheren Versuchsaufbau im Labormaßstab, welche aufgrund des Fehlens beweglicher Einbauten wie Rührerlagerungen weniger mögliche Zündquellen aufweist. Am Institut für Technische Biokatalyse wurden in der Vergangenheit diverse Synthesen wie die enzymatische Veresterung zu Myristylmyristat in Blasensäulen etabliert, weshalb hier auf das KnowHow im Betrieb von Blasensäulen aufgebaut werden kann [20, 21].

Ein Enzymsystem, welches Alkane wie Butan oxidiert, ist das *AlkBGT* Monooxygenase Reaktionssystem aus *Pseudomonas oleovorans GPO1*, einem ölabbauenden Bakterium, welches auf Alkanen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Die membrangebundene Monooxygenase *AlkB* oxidiert dabei Butan über die Oxidationsstufen Butanol und Butyraldehyd hin zur Buttersäure. Beim Industriepartner des Projektes, Evonik Industries, wurde das *AlkBGT* Enzymsystem zur Oxidation von kurzkettigen Alkanen bereits untersucht und bzgl. Butanumsatz patentiert [22, 23, 24]. Dabei stellt die Buttersäure im klassischen Sinne kein Wertprodukt dar, jedoch besitzt das Enzymsystem eine hohe Aktivität, was vorteilhaft für eine Prozesscharakterisierung ist. Die hohe Aktivität erlaubt es den Prozess so zu betreiben, dass der Stofftransport ins Medium und nicht die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation limitierend ist. So ist gewährleistet, dass durch Variation der Prozessparameter der Einfluss auf den Butaneintrag ins Medium respektive die volumetrische Produktivität nicht durch das biologische System eingeschränkt wird. Erst unter dieser Voraussetzung ist eine Charakterisierung durch Variation der Prozessparameter möglich. Zudem besitzt das Produkt Buttersäure eine hohe Löslichkeit und einen geringen Dampfdruck, daher ist eine robuste Produktquantifizierung möglich, da ein Austrag von Buttersäure mit dem Abgasstrom aus der Blasensäule im Vergleich zu Butanol oder Butyraldehyd gering ist. Das *AlkBGT* Enzymsystem exprimiert in *E. coli* ist damit ideal als ein Modellsystem. Zudem wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass weitere Enzymsysteme an das *AlkBGT* Enzymsystem angekoppelt werden können, um Wertprodukte, wie z.B. Rhamnolipide aus Butan zu erzeugen [25, 26].

Vor einer industriellen Anwendung steht stets die Abschätzung auf Datenlage aus dem Labor- bzw. Pilotmaßstab. Im Labormaßstab ist es nötig die Durchführbarkeit des Prozesses aufzuzeigen. Eine Charakterisierung des Prozesses bzgl. der relevanten Prozessparameter Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butananteil ist dabei unabdingbar sowie eine Abgrenzung des Prozessfensters. Auch eine Abschätzung der Robustheit sowie eine Sicherheitsanalyse bei der Verwendung von Butan-Luft-Gemischen sind hierfür obligatorisch. Als erster logischer Schritt steht somit die Etablierung der fermentativen Butanoxidation im Labormaßstab in der Blasensäule. Darauf aufbauend kann die Prozesscharakterisierung erfolgen und das Prozessfenster für eine weitere Skalierung begrenzt werden. So kann eine volumetrische Produktivität und Ausbeute abgeschätzt werden und erlaubt beim Einsatz eines anderen Enzymsystems die Übertragbarkeit hin zu einem Wertprodukt. Auf dessen Basis kann dann die Entscheidung getroffen werden, inwieweit der Prozess ökonomisch sinnvoll ist und es kann eine entsprechende Butanoxidation im industriellen Maßstab etabliert werden.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Charakterisierung einer fermentativen Oxidation von Butan mittels *E. coli* in einem Blasensäulenreaktor im Labormaßstab.

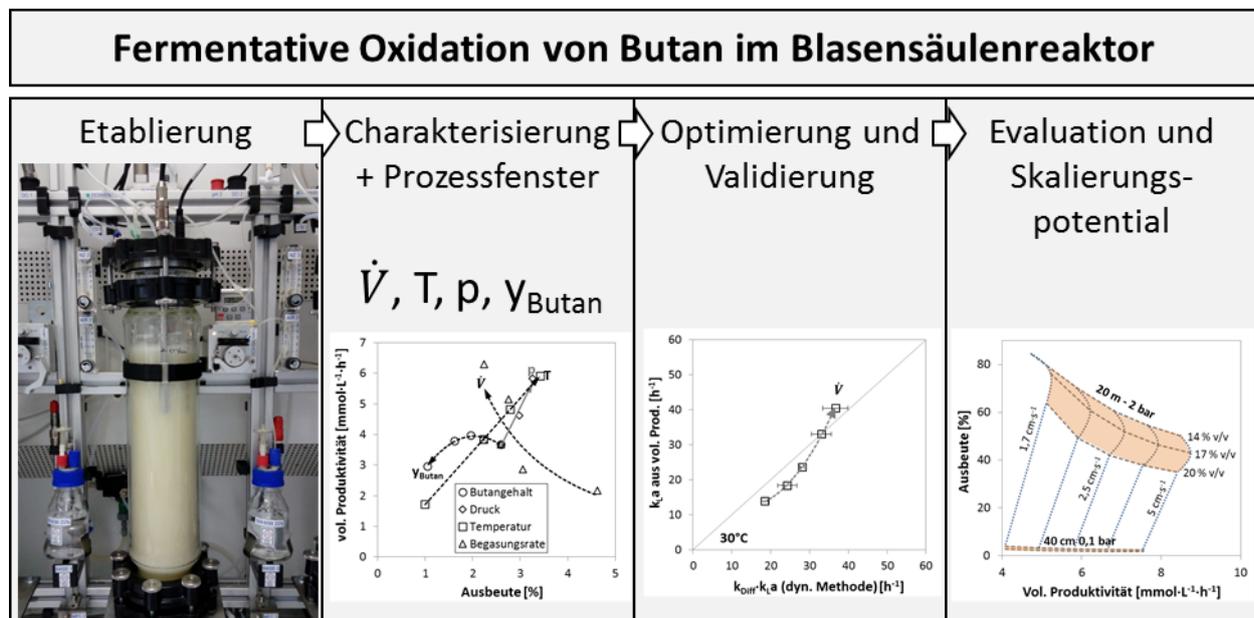


Abbildung 1 : Projektschema der fermentativen Oxidation von Butan im Blasensäulenreaktor

Dabei soll zunächst die Gasversorgung und der dafür notwendige Reaktor mit Kontrollsystem konstruiert werden, wobei der Sicherheitsaspekt im Umgang mit Butan-Luft Gemischen im

Vordergrund steht. Nach Bereitstellung der Begasungs-Infrastruktur des Reaktors soll der Prozess dahingehend charakterisiert werden, dass ein Prozessfenster mit den relevanten Prozessparametern Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butananteil erstellt wird. Das sich daraus ergebene Prozessoptimum soll verifiziert und für eine erste Abschätzung einer Skalierung und dessen Diskussion genutzt werden.

3 Stand der Technik

Biokatalytische Prozesse sind schon seit Jahrzehnten in der Industrie etabliert [16]. Dabei kommen sowohl Mikroorganismen als auch aufgereinigte Enzympräparate zum Einsatz. Sowohl für die Verwendung von Enzympräparationen als auch für den Einsatz von Mikroorganismen/Zellen finden sich dabei Beispiele für hochpreisige Komponenten mit geringen Produktionsmengen der Feinchemie oder Pharmaindustrie als auch für groß skalierte Produkte der Lebensmittelindustrie [27, 28, 29]. Die Entscheidung, welche Form des Biokatalysators wirtschaftlich am sinnvollsten ist, hängt dabei vom eigentlichen Prozess und der verfahrenstechnischen Umsetzung ab. Besonders bei der Verwendung von Enzymsystemen, welche auf kostenintensive Kofaktoren angewiesen sind, in Zusammenhang mit einem vergleichsweise niedrigpreisigen Produkt, ist ein fermentativer Ansatz interessant [17]. Hierbei können die Zellen sowohl in der Wachstumsphase als auch ruhend eingesetzt werden. Klassische biotechnologische Prozesse verwenden dabei in Lösung gebrachte Kohlenhydrate wie Glukose als Kohlenstoffquelle für das mikrobielle Wachstum bzw. die Produktion des Wertstoffes innerhalb der Zelle [28].

Bei Biotransformationen werden die Substrate auch in Lösung gebracht, wobei die Stoffkonzentration im Medium im Rahmen der Löslichkeit vergleichsweise einfach bei flüssigen Substraten über die Zufuhr realisiert werden kann. Sind am Prozess Stoffe beteiligt, die unter den Systembedingungen gasförmig vorliegen, können diese durch Begasung in den Reaktor eingeleitet werden. Dabei ist die Löslichkeit der gasförmigen Komponente im Medium für den Stofftransport ins Medium entscheidend [12, 14, 15, 16]. Die Löslichkeit liegt für die meisten Gase, wie beispielsweise Sauerstoff, um einige Größenordnungen geringer als die von Glukose oder anderen Substraten im wässrigen Medium. Oft sind diese Prozesse durch den Stofftransport der gasförmigen Komponente ins wässrige Medium limitiert und werden so betrieben, dass ein möglichst hoher Gaseintrag vorliegt [29]. So benötigen

Hochzell-dichtefermentationen einen hohen Sauerstoffeintrag, um während der exponentiellen und Zufuhr-Wachstumsphase genügend hohe Sauerstoffkonzentrationen im Medium zu gewährleisten. Der Stofftransport von Sauerstoff ins Medium ist dabei einer der wichtigsten Parameter beim Betrieb und bei der Skalierung von fermentativen Prozessen [29].

Darüber hinaus liegen auch weitere Stoffe wie Kohlenstoffdioxid, Kohlenstoffmonoxid, Wasserstoff sowie kurzkettige Alkane wie Methan bis Butan und deren Alkene bei den klassischen Fermentationsbedingungen von 20°C bis 40°C und Atmosphärendruck gasförmig vor. Ein Eintrag ins Reaktionsmedium lässt sich dabei nur über eine direkte Begasung mit Blasen oder einer Membranbegasung effektiv realisieren. In klassischen gerührten Fermentern wird das Gas unterhalb der Rührer eingebracht und durch die Scherkräfte des Rührers werden die Gasblasen beim Aufsteigen zerteilt, die Gas-Flüssig-Oberfläche vergrößert und der Stofftransport ins Medium erhöht [15]. Zur weiteren Verbesserung des Stofftransportes ins Medium wurden diverse Konstruktionen wie Rührertyp und -geometrie, Reaktoreinbauten und Begasungsadapter diskutiert und experimentell charakterisiert [28, 30]. Neben dem Rührkessel können auch Blasensäulen als Reaktor genutzt werden, welche durch den Aufstieg der eingeleiteten Gasblasen eine Durchmischung des Reaktors realisieren [31, 32, 33]. Dabei ist der Leistungseintrag in den Reaktor gegenüber gerührten Fermentern wesentlich geringer und nur durch die erforderliche Kompressionsarbeit des Gases für den erforderlichen Gasvolumenstrom quantifiziert [33]. Der Blasensäulenreaktor erlaubt eine Durchmischung mit geringen Scherkräften und bei entsprechender Höhe auch langen Verweilzeiten der aufsteigenden Blasen im Reaktor und damit längere Zeit für den diffusiven Stofftransport und somit hohe Ausbeuten [18, 31, 33].

Daneben existieren weitere Reaktorkonzepte (siehe Abbildung 2) welche einen Stoffaustausch über die Gas-Flüssig-Grenzfläche ermöglichen. Während beim Rührkessel oder der Blasensäule die Gasphase dispers vorliegt, kann auch die Flüssigphase dispers vorliegen. Gas-Flüssig-Kontaktoren wie Rieselbettreaktoren und Sprühtürme haben dabei auf das gesamte Reaktorvolumen nur ein kleines Flüssigkeitsvolumen. Hier kann pro Flüssigvolumen ein hoher Stoffeintrag realisiert werden, jedoch sind große Reaktorvolumina nötig, um dieselben Flüssigkeitsmengen bei gleichem Stoffeintrag zu prozessieren wie z.B. in der Blasensäule [35]. Weitere Reaktortypen sind Fallfilmreaktoren oder Modifikationen von Säulen- und Schlaufenreaktoren mit Einbauten, Rührern oder unterschiedlichen Begasungsadaptoren. Viele

dieser Systeme haben die Flüssigphase im Umlauf, was sich bei der Fermentation durch die Scherkräfte der Pumpe negativ auf die Stabilität der Zellen auswirken kann. Zudem haben diese hydraulisch betriebenen Reaktoren deutlich höhere Betriebskosten. Strahl-Düsen zur Dispersion der Gasphase bzw. Ejektor oder Injektoren in der Blasensäule ermöglichen hohe Phasengrenzflächen, eignen sich jedoch nur bedingt bei scherkraft-anfälligen Mikroorganismen.

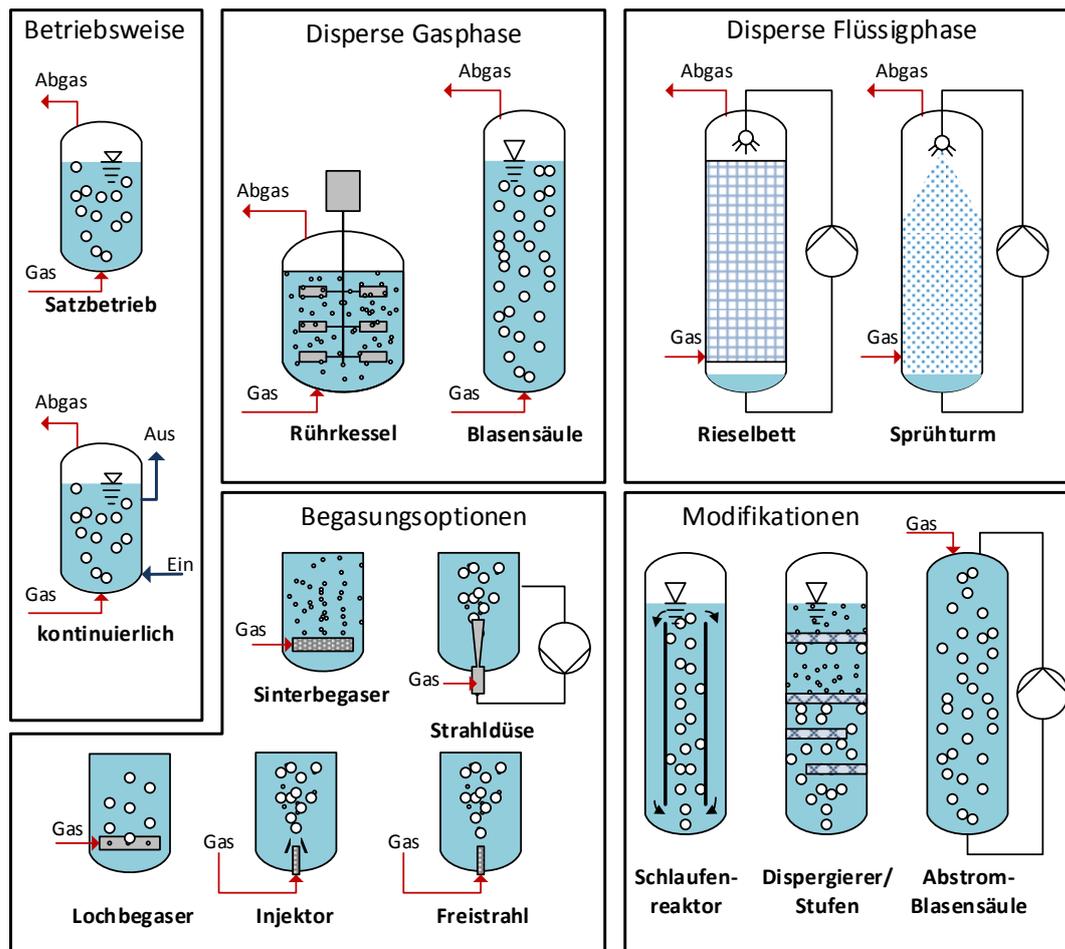


Abbildung 2 : Funktionsprinzip verschiedener Reaktoren für den Gas-Flüssig-Kontakt sowie deren Betriebsweise; verschiedenen Begasungsoptionen und Modifikationen.

Vergleichend gegenübergestellt sind Reaktorkonzepte für die Fermentation gasförmiger Substrate in Tabelle 1 bzgl. des Einsatzbereiches. Die von *Storhas* zusammengefassten Werte sind dabei besonders den $k_L a$ -Wert betreffend nur unter absolut optimalen Bedingungen erreichbare Werte [37]. Diese Übersicht zeigt die Bereiche bzgl. Reaktorvolumen und Stofftransportkennzahlen der unterschiedlichen Reaktoren.

Großtechnische Fermentationen zur Produktion von Einzellerprotein in Blasensäulen mit bis zu 70 m Höhe und bis zu 1500 m³ Reaktionsvolumen sind schon etabliert worden [35]. Für Syngasfermentationen bei denen Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff fermentativ

umgesetzt werden, sind industriell Blasensäulen etabliert welche Mengen bis zu 80000 m³ pro Jahr bei Ausbeuten von 70 % - 80 % bzgl. Kohlenstoffmonoxid verarbeiten [39, 40]. Die Höhe der Blasensäule hat dabei auch Einfluss auf die Verweilzeitverteilung der Gasblasen und so kann durch die Vergrößerung der Blasensäulenhöhe die Verweilzeit der Gasblasen und damit auch die Ausbeute erhöht werden [40]. Auch in der chemischen Industrie sind Blasensäulen als Reaktoren bei großtechnischen Prozessen wie der Phenol-Synthese aus Cumol im Einsatz [39]. Dabei lässt sich bei Blasensäulen durch Trennung der Strömungsbereiche der Stofftransport bzw. die Verweilzeit der Blasen erhöhen. Bei diesen Schlaufenreaktoren führt die Begasung in einem Teil des Reaktors zum Aufstieg der Blasen und mit der einhergehenden Verdrängung der Flüssigkeit zu einer entgegengesetzten Strömung des Mediums im anderen Teil des Reaktors (vgl. Air-Lift-Reaktor in Tabelle 2). In diesem Umlauf können Gasblasen mit der Strömung mitgerissen werden und so wieder nach unten in den Reaktor geführt werden. Die entsprechende Verweilzeiterhöhung führt dabei zu einer höheren Ausbeute [32, 34].

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Reaktortypen für die Fermentation mit verschiedenen Kennzahlen zur Abschätzung der Einsatzbereichsmöglichkeit; Auswahl von Storhas [35].

Reaktortyp	Mech. Antrieb	belüftet (1 vvm)	k _{La} (max.)	OTR <	Volumen (max.)	Kosten (relativ)	H/D Verhält.
	[kW·m ⁻³]	[kW·m ⁻³]	[h ⁻¹]	[g·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	[m ³]	[-]	[-]
Blasensäule	-	0,6	160	1,5	900	1	5-10
Air-Lift Reaktor	-	0,5	150	2	400	2	5-10
Strahldüsenreaktor	3,5	1	800	6	300	7	2-6
Rührkessel	10	4,5	2000	15	400	9	2-3

In der Forschung ist der Blasensäulenreaktor dabei schon seit 2008 am Institut für Technische Biokatalyse. So konnte gezeigt werden, dass die energieeffiziente und schonende Durchmischung des Mediums, besonders bei vergleichsweise hoher Viskosität des Mediums, ein Vorteil in der Verwendung von auf Partikel immobilisierten Enzymen aufweist. Während diese in gerührten Reaktoren durch die auftretenden Scherkräfte Abrieb erfahren, bleiben diese in der Blasensäule länger intakt und können häufiger rezykliert werden [20, 36]. In weiteren Arbeiten zur Blasensäule wurde ein Online-Monitoring einer Fettsäureveresterung etabliert und evaluiert, um den Prozess optimal regeln zu können [36]. Daneben fanden eine Analyse der höhenspezifischen Stofftransportkoeffizienten für Kohlenstoffdioxid in Cumol in

der Blasensäule und die Quantifizierung des Transportwiderstandskoeffizienten statt [37]. Während die Fermentationen mit (Luft)Sauerstoff, Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff Thema diverser Forschungsansätze sind [8, 15], ist die Fermentation kurzkettiger Alkane kaum im größeren Maßstab etabliert. Besonders kurzkettige Alkane sind dabei Nebenprodukte beim Cracking von Erdöl. Diese Nebenprodukte fallen in Raffinerien und Chemieparks im kilotonnen-pro-Jahr-Maßstab an und werden oft zur Energie- und Wärmegewinnung verbrannt [38]. Bei Alkanen bzw. dem Äquivalent Naphtha sind die Kosten pro Masse zwar höher als bei Zucker bzw. Glukose, jedoch sind die Kosten pro Energiegehalt mit ca. 40 % gemittelt im Jahr 2015 deutlich geringer [26]. Eine Verwendung zur fermentativen Wertstoffproduktion aus kurzkettigen Alkanen kann dabei je nach Produkt, volumetrischer Produktivität und Ausbeute wirtschaftlich interessant sein. Dabei sind diverse Enzymsysteme bekannt, welche Alkane als Substrat umwandeln können [9, 10]. Im Institut für Technische Biokatalyse wurden zudem bereits diverse Arbeiten zur Umsetzung und zum Abbau von Alkanen und weiteren Komponenten aus fossilen Brennstoffen untersucht [40, 41].

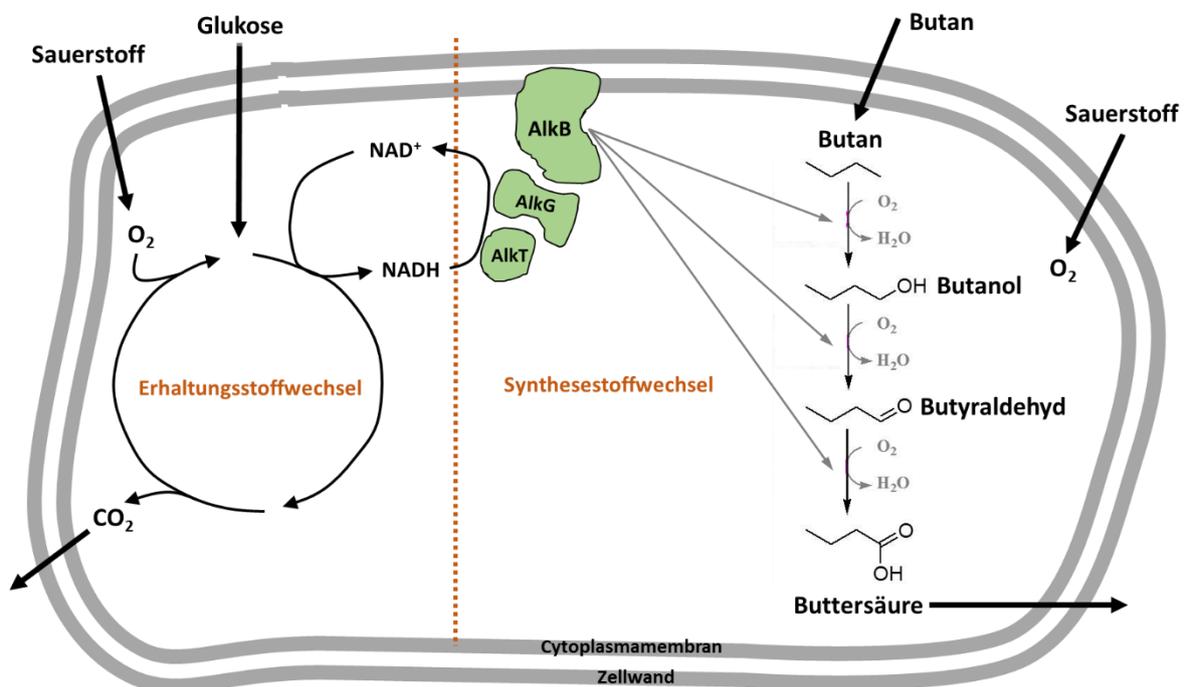


Abbildung 3 : Reaktionsschema der Butanoxidation durch das AlkBGT-Enzymsystem exprimiert in einer Wirtszelle; Erhaltungsstoffwechsel zur Kofaktorregenerierung und Synthesestoffwechsel zur Oxidation von Butan zur Buttersäure; Adaption nach Schrewe et al.[7].

Das Alkan-Monooxygenase Enzymsystem *AlkBGT* aus *Pseudomonas oleovorans* GPo1 ist dabei in verschiedenen Arbeiten diskutiert [11, 42]. Dieses oxidiert Butan endständig über die Oxidationsstufen Butanol und Butyraldehyd hin zur Butansäure. Es kann mittels Vektors in

einer Wirtszelle exprimiert werden und ermöglicht so einen Synthesestoffwechsel innerhalb der Zelle, wobei die benötigte Kofaktorregenerierung über den Erhaltungstoffwechsel der Zelle realisiert wird. Die membrangebundene Monooxygenase AlkB benötigt dabei zusätzlich die Proteine Rubredoxin AlkG und die Rubredoxin Reduktase AlkT für den Elektronentransfer vom Kofaktor NADH. Das in die Wirtszelle diffundierte Butan wird dabei durch die Monooxygenase zuerst zum Butanol oxidiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die weitere Oxidation des Butanols zum Butyraldehyd. Bei jedem Oxidationsschritt werden jeweils eine Kofaktormolekül NADH und ein ebenfalls in die Zelle diffundiertes Sauerstoffmolekül umgesetzt. Als letzten Reaktionsschritt wird das Butyraldehyd zur Buttersäure oxidiert, welche als Endprodukt akkumuliert oder ggf. auch weiter verstoffwechselt werden könnte. Zur Aufrechterhaltung der Kofaktorregenerierung bzw. des Erhaltungstoffwechsels der Zelle muss zudem eine Glukosezufuhr gewährleistet werden. Zudem wird der Sauerstoff nicht nur für die Oxidation, sondern auch für den Erhaltungstoffwechsel der Zellen benötigt.

Beim dem an dieser Arbeit beteiligten Industriepartner Evonik Industries wurde zudem die Oxidation von Butan mittels AlkBGT Enzymsystem in *E. coli* bereits patentiert [23]. Der verwendete Organismus wurde dabei entsprechend charakterisiert und zeigte im Vergleich zu anderen Enzymsystemen eine hohe Butanaufnahmerate bzw. spezifische Aktivität [5]. Zudem ist das AlkBGT Enzymsystem in Verbindung mit weiteren Wirtszellen in der Lage, diesen Zellen Buttersäure aus Butan als einzige Kohlenstoffquelle zu Verfügung zu stellen, um damit Erhaltungstoffwechsel und Wertstoffproduktion zu betreiben. Eine entsprechende Anwendung zur Produktion von Rhamnolipiden aus Butan wurde bereits etabliert [25, 26]. Dabei erlaubt das AlkBGT System eine schnelle und robuste Alkanaktivierung, um das im Medium gelöste Butan hin zur Buttersäure zu oxidieren. Um einen Prozess zur fermentativen Nutzung von Butan zu charakterisieren, bedarf es einem System, welches durch hohe Aktivität eine Limitation durch die Mikroorganismen vermeiden kann. Der Stoffeintrag ins Medium sollte dabei stets kleiner sein als die Gesamtzellaktivität, um möglichst jedes eingetragene Substratmolekül umzusetzen und eine exakte Bilanzierung zu ermöglichen. Deshalb ist das AlkBGT System ideal als Modellsystem, um den entsprechenden Prozess im Labormaßstab zu charakterisieren. Dabei sind in der Literatur bisher nur Versuche im Kleinstmaßstab mit gasförmigem Butan und AlkBGT-System beschrieben. Zudem konnte bisher keine weitere Beschreibung eines fermentativen experimentellen Setups mit entsprechender kontinuierlicher Begasung mit Butan/Luft-Gemischen in der Literatur gefunden werden.

4 Theorie

Im Folgenden sind die relevanten Grundlagen aufgeführt, welche für eine Diskussion des betrachteten Prozesses notwendig sind.

4.1 Blasensäulenreaktoren

Die Blasensäule ist als verfahrenstechnischer Reaktor in diversen industriellen Produktionen weltweit im Einsatz. Dabei besteht sie im einfachsten Fall aus einem hohlzylinderförmigen Behälter, wobei stets große H/D-Verhältnisse im Vergleich zu Rührkesseln vorliegen. Am Boden der Blasensäule wird ein Gasstrom eingeleitet, wobei diverse Begasungsadapter die Blasengrößenverteilung beeinflussen. Aufgrund des Dichteunterschiedes und dem sich daraus ergebenden Auftrieb steigen die Blasen in der Blasensäule nach oben. Dabei wird die Flüssigkeit verdrängt und es bildet sich eine Flüssigkeitsströmung entgegengesetzt zur Blasenströmung aus. Die Flüssigkeitsströmung kann dabei durch spezielle Einbauten gelenkt werden. Die Durchmischung wird bei der Blasensäule durch den Aufstieg der Blasen realisiert. Diese weist im Vergleich zu Rührkesseln geringe Scherkräfte bei gleichem Leistungseintrag auf. Zudem können leicht flüchtige Reaktanden über den Gasstrom ausgetragen werden (Stripping). Im Vergleich zu Rührkesseln haben Blasensäulen meist einen geringeren Gaseintrag, da ein Einwirken von Scherkräften auf die Gasblasen an den Rührblattspitzen wegfällt. Kommt es dabei zu Zerkleinerung der Gasblasen, vergrößern sich die spezifische Oberfläche und damit meist der Stofftransport des Gases ins Medium. Auch einer Koaleszenz der Blasen kann durch die Scherwirkung des Rührers entgegengewirkt werden. Blasensäulen entgegen besitzen kein Rührorgan und es kann nur durch spezielle statische Einbauten einer Koaleszenz entgegengewirkt werden. Meistens vergrößert sich der Anteil größerer Blasen an der Blasengrößenverteilung über die Steighöhe auf Grund der Koaleszenz kleinerer Blasen. Dabei haben die Blasen besonders bei großen Steighöhen lange Verweilzeiten in der Blasensäule. Daraus resultiert eine längere Dauer für den Stofftransport aus einer Gasblase ins umgebende Medium. Dieses wiederum führt zu höheren Ausbeuten als bei Rührkesseln. Die Transportprozesse in Blasensäulen sind dabei in der Literatur vielseitig beschrieben [33] [30] [44] [29] [31]. Oft werden Näherungen getroffen, um die Prozesse abbilden zu können [45] [46]. Dabei sind diverse Parameter wie Reaktorgeometrie, Begasungsadapter, Einbauten, Begasungsrate bzw. Leerrohrgeschwindigkeit, Druck, Temperatur, Medium und Gaszusammensetzung beschrieben, welche einen signifikanten Einfluss auf die

Transportprozesse in einer Blasensäule haben. Weiter ist bei einer Skalierung darauf zu achten, inwieweit Wandeffekte berücksichtigt werden müssen. Diese treten an der Grenzfläche von Reaktorwand und Flüssigkeit auf und beeinflussen das Strömungsverhalten und damit auch die Transportprozesse innerhalb der Blasensäule. Bei kleinen Innendurchmessern der Blasensäule ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so groß, dass die Wandeffekte einen signifikanten Einfluss haben. Bis zu einem Blasensäulendurchmesser von 12 – 15 cm kann der Einfluss der Wandeffekte sich dabei deutlich auf das Strömungsverhalten und damit den Stofftransport und die Verweilzeit auswirken. Je größer der Blasensäulendurchmesser desto kleiner das Verhältnis von Wandfläche zu Volumen. Wird das Verhältnis von Wandfläche zu Volumen zu groß (kleiner Blasensäulendurchmesser) wird die Interaktion der Gasblasen mit der Reaktorwand relevant. Hier kann es zu Strömungen kommen, welche bei größeren Blasensäulen mit gleichem H/D-Verhältnis nicht auftreten. Eine direkte Skalierung ist deshalb bei Wandeffekten unter Umständen nicht möglich. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Blasensäule mit 8 cm Innendurchmesser sollte deshalb auf Wandeffekte geachtet werden (siehe 6.4.1). Der Stofftransport in Blasensäulen lässt sich über verschiedene Beziehungen charakterisieren. Im Folgenden sind die hier betrachteten Parameter erläutert, welche signifikanten Einfluss auf die volumetrische Produktivität und Ausbeute der Blasensäule haben.

4.1.1 Löslichkeit, k_{La} -Wert und Stofftransport

Die maximale Löslichkeit ist stoffspezifisch bzgl. des sich lösenden Stoffes und des Mediums, in das die Einlösung stattfindet. Hierbei muss zwischen Stoffen unterschieden werden, welche bei den gegebenen Systembedingungen (Temperatur und Druck) fest, flüssig oder gasförmig vorliegen. Im Falle von Glukose können bei 20 °C ca. 470 g·L⁻¹ (das entspricht ca. 2600 mmol·L⁻¹) in reinem Wasser gelöst werden. Die Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten sinkt mit steigender Temperatur, wobei für Luftsauerstoff bei Umgebungsdruck und 20 °C eine maximale Löslichkeit von 0,3 mmol·L⁻¹ (9,6 mg·L⁻¹) vorliegt. Über die Henry-Beziehung (T01) lässt sich die maximale Löslichkeit eines gasförmigen Stoffes c_i^* [mmol·L⁻¹] in einem spezifischen Medium mit dem dazugehörigen Henry-Koeffizienten H^{cp} [mmol·L⁻¹·bar⁻¹] für eine bestimmte Temperatur T [K] bei einem definierten Druck bestimmen [48].

$$c_i^* = y_i \cdot p_{ges} \cdot H^{cp} \cdot \text{EXP} \left(C \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right) \quad (\text{T01})$$

Wobei y_i den Molenbruch [$\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$] des Stoffes im Gas, p_{ges} den Gesamtdruck [bar] und somit der Ausdruck $y_i \cdot p_{ges}$ den Partialdruck [bar] des Stoffes i beschreibt. Der Exponentialterm beinhaltet die Temperaturabhängigkeitskonstante C [K] und die Referenztemperatur T_{ref} [K]. Setzt sich die Gasatmosphäre des Systems aus verschiedenen Komponenten zusammen, kann so für jede einzelne Komponente ihre Löslichkeitsgrenze entsprechend ihres Partialdrucks bestimmt werden. So ergibt sich analog in Abbildung 4 die Löslichkeit [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$] von Butan und Luftsauerstoff in Wasser für die jeweiligen Mischungsverhältnisse in Abhängigkeit der Temperatur bei 1013 hPa.

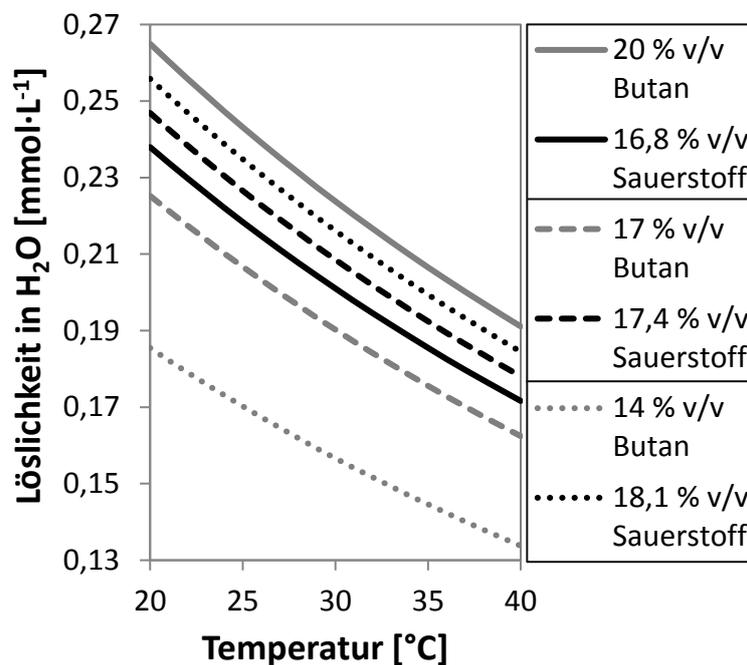


Abbildung 4 : Löslichkeit von Butan und (Luft)Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit der Temperatur bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Butan mit Luft (21 % v/v Sauerstoff 79 % v/v Stickstoff); 20 % v/v Butan mit 80 % v/v Luft resultiert somit in 16,8 % v/v Sauerstoff; Abschätzung mit Henry-Koeffizienten aus NIST Datenbank [49].

Bei einer Mischung aus 20 % v/v Butan mit 80 % v/v Luft (16,8 % v/v Sauerstoff) liegt die maximale Löslichkeit von Butan mit $0,265 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ um 11 % höher als die von Sauerstoff. Wird der Butananteil bei einer Mischung aus 14 % v/v Butan und 86 % v/v Luft (18,1 % v/v Sauerstoff) reduziert, ergibt sich eine maximale Löslichkeit von Butan von $0,185 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ welche bei diesem Verhältnis um 38 % geringer ist als die maximale Löslichkeit von Butan. Aus der Differenz der Sättigungskonzentration und der Konzentration des im Medium gelösten Stoffes ergibt sich der stoffspezifische Konzentrationsgradient, welcher für einen Stofftransport die treibende Kraft darstellt. Um den Stofftransport über Phasengrenzen vereinfacht zu beschreiben, wird häufig der volumenbezogene Stofftransportkoeffizient $k_{L,a}$

herangezogen. Dieser wird reziprok zu einer definierten Zeiteinheit angegeben und beschreibt wie oft ein festgelegtes Volumen eines spezifischen Mediums pro gewählte Zeiteinheit in Abhängigkeit eines Konzentrationsgradienten mit einem spezifischen Stoff gesättigt werden kann. Im folgenden Beispiel wurde für einen Reaktor mit 1 Liter Wasser als Medium ein k_{La} -Wert von 10 h^{-1} bei einer Begasung mit Luftsauerstoff gemessen. Das bedeutet, dass pro Stunde theoretisch 10-mal die maximale Löslichkeitsmenge von Luftsauerstoff in Wasser eingetragen werden könnte, wenn im Reaktor ein Verbraucher die Konzentration an gelöstem Sauerstoff stets auf null reduziert. Der k_{La} -Wert stellt dabei den Transportwiderstand k_L an einer Phasengrenzfläche a dar. Beim Stofftransport von einer Gasblase ins umgebende Medium wird dabei von zwei Grenzschichten ausgegangen (siehe Abbildung 6). Eine auf der Gasseite und eine auf der Flüssigkeitsseite des Mediums. Dabei kann für beide Grenzschichten ein Transportwiderstand definiert werden. In den meisten Fällen ist der Transportwiderstand über die flüssigseitige Grenzfläche signifikant höher, weshalb dieser Transportwiderstand k_L limitierend ist und für Berechnungen herangezogen wird. Dabei ist eine Messung des Transportwiderstandes k_L bzw. der Phasengrenzfläche a nicht immer getrennt voneinander möglich. Hier wird oft die Kombination beider Parameter in Form des k_{La} -Wertes gemessen. Dazu werden in der Literatur verschiedene Messmethoden diskutiert, wobei die dynamische Methode weit verbreitet ist [31, 55]. Dabei wird die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium C_L bis zur Sättigung C^* gemessen wobei der Stoffeintrag durch eine Begasung mit Luft-Sauerstoff realisiert wird. Hierfür sind die notwendigen robusten Sensoren mit geringen Ansprechzeiten kommerziell erhältlich. Dabei wird ein Reaktor mit definierten Zustandsgrößen (Medium, Temperatur, Druck, Begasungsrate) zuerst mit Stickstoff und Luftsauerstoff im jeweiligen Sättigungszustand kalibriert. Danach erfolgt eine Sättigung mit Stickstoff. Ist hier der Gleichgewichtszustand erreicht, wird eine definierte Begasung mit Luft-Sauerstoff gestartet. Dabei wird der zeitliche Verlauf der Konzentration von gelöstem Sauerstoff im Medium registriert. Durch die Auftragung von $\ln\left(1 - \frac{C_L}{C^*}\right)$ über die Zeit t ergibt sich aus der negativen Regressionsgradensteigung der k_{La} -Wert. Um mit dem k_{La} -Wert den Stofftransport von Sauerstoff ins Medium zu bestimmen, wird dieser mit dem Konzentrationsgradienten in folgender Gleichung (T02) als Sauerstofftransferate $[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$ (OTR – **O**xygen **T**ransfer **R**ate) definiert. Wobei der k_{La} -Wert als volumenbezogener Stofftransportkoeffizient $[\text{h}^{-1}]$ vorliegt. Die maximale Löslichkeit von

Sauerstoff bei den gewählten Prozessgrößen (Medium, Temperatur, Druck) c^* [mmol·L⁻¹] und die aktuelle Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium c_L [mmol·L⁻¹].

$$OTR = k_L a_{O_2} \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \quad [T02]$$

Hier können für die Koeffizienten auch analog andere Einheiten verwendet werden. So kann der k_{La} -Wert pro Minute oder die Löslichkeit in Milligramm pro Liter verwendet werden, wobei sich entsprechend der Einheit der Stofftransportrate ändert. Ist bei der Messung des k_{La} -Wertes eine Sauerstoffsinke oder Sauerstoffverbraucher z.B. durch Mikroorganismen vorhanden, muss die Gleichung T02 um die Sauerstoffaufnahme der Zellen (OUR) korrigiert werden. Soll nun die Stofftransportrate eines anderen Stoffes bestimmt werden, können verschiedene Ansätze gewählt werden.

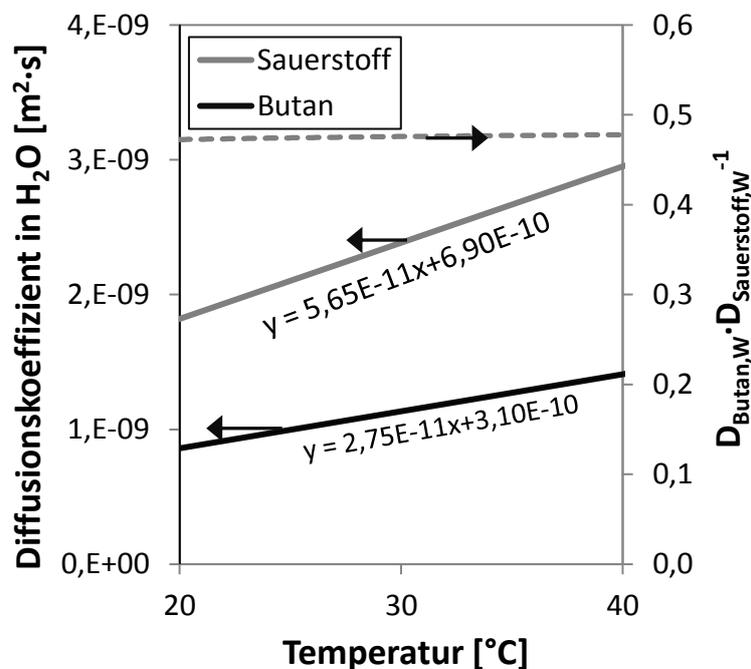


Abbildung 5 : Diffusionskoeffizienten für Butan und Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit der Temperatur (20°C - 40°C); Werte ermittelt mit der Software Aspen (Aspentech); Sekundäre Ordinate mit der Wurzel aus dem Quotienten der beiden Diffusionskoeffizienten

Oft ist es nicht möglich, die Konzentration des gelösten Stoffes zeitlich ausreichend aufgelöst zu überwachen. In diesem Fall wird der k_{La} -Wert mit einem leicht zu messenden Stoff wie Sauerstoff bestimmt und dann entsprechend für einen anderen Stoff korrigiert. Diese Korrektur erfolgt bei der Zweifilmtheorie über den Quotienten der Diffusionskoeffizienten. Ist für den gewählten Stoff der Diffusionskoeffizient, am besten in Abhängigkeit der Temperatur bekannt, kann dieser in Relation zum Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff (im selben Medium) gesetzt werden.

Daraus ergibt sich ein Korrekturfaktor, welcher in Abhängigkeit der Temperatur den $k_L a$ -Wert skaliert. Die Prozessparameter innerhalb des Reaktors haben auf die verschiedenen Variablen und Terme der Stofftransportgleichung unterschiedliche Einflüsse. Der Koeffizient für den Stofftransportwiderstand k_L hängt vom betrachteten Stoff und vom umgebenden Medium und dessen Eigenschaften ab. So steigen mit der Temperatur die Diffusionsgeschwindigkeit und die Viskosität des Mediums nimmt ab. Genauso wird k_L durch die Grenzschicht beeinflusst, die wiederum von Faktoren wie Temperatur und Medium abhängt.

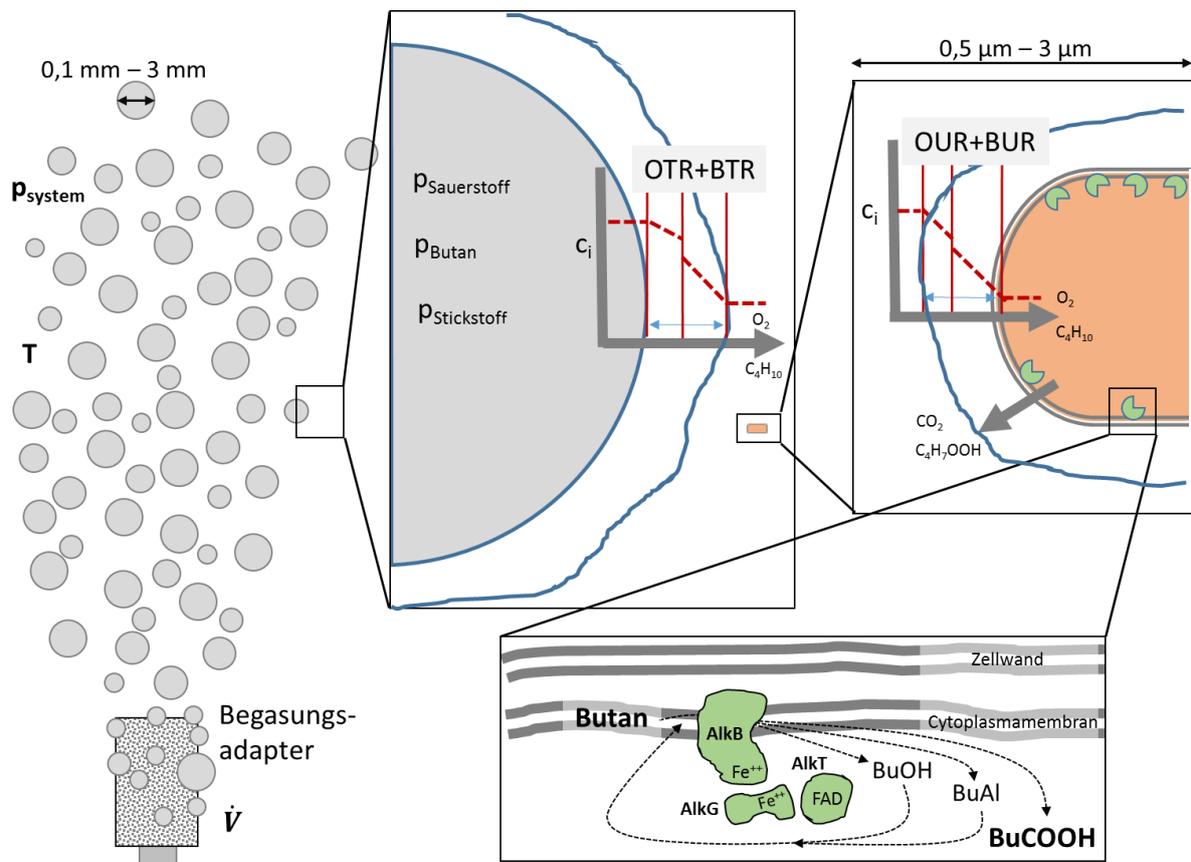


Abbildung 6: Systematische Darstellung des Stofftransports von Sauerstoff und Butan von der Gasblase ins Medium und vom Medium in die Zelle; Stofftransportrate und Richtungen gekennzeichnet. Innerhalb der Zelle Oxidation von Butan zur Buttersäure über das AlkBGT Monooxygenase Enzymsystem; Nähere Beschreibung der Enzymreaktion in Kapitel 4.2.1;

Mit dem Ansatz der Zweifilmtheorie kann von einem stoffspezifischen $k_L a$ -Wert auf einen weiteren geschlossen werden, insofern für beide Stoffe die Diffusionskoeffizienten im selben Medium und Temperaturbereich bekannt sind. So lässt sich für Butan und Sauerstoff der Quotient der jeweiligen Diffusionskoeffizienten temperaturabhängig darstellen. Dieser kann zur Skalierung des für Sauerstoff gemessenen $k_L a$ -Wertes herangezogen werden, um den $k_L a$ -Wert für Butan unter denselben Messbedingungen abzuschätzen. In Abbildung 5 sind die

Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff und Butan in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Zur Berechnung des Stofftransports wurde der Quotient der Diffusionskoeffizienten von Butan und Sauerstoff aufgetragen. Der entsprechende Skalierungswert liegt im Mittel bei 0,48 und ändert sich im in dieser Arbeit untersuchten Temperaturbereich um weniger als 0,5 %. Der $k_L a$ -Wert für Butan beträgt somit 48 % vom unter denselben Bedingungen gemessenen $k_L a$ -Wert mit Sauerstoff. So kann analog zu Formel T02 die Butantransferate BTR [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] aus dem $k_L a$ -Wert [h^{-1}] von Sauerstoff und dem Skalierungsfaktor [-] der Diffusionskoeffizienten mit der Löslichkeit [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$] definiert werden.

$$BTR = k_L a_{O_2} \cdot \frac{D_{Butan}}{D_{O_2}} \cdot (c_{Butan}^* - c_{Butan}) \quad [T03]$$

Neben der Zwei-Film-Theorie sind in der Literatur noch weitere Ansätze für die Beschreibung des Stofftransportes von der Gasblase ins Medium beschrieben [26]. So werden bei der Penetrations-Theorie und der Oberflächenerneuerungs-Theorie verschiedene Szenarien der Stoffdiffusion mathematisch einbezogen. Dabei ändert sich der Skalierungsterm welcher schon bei der Zwei-Film-Theorie als Quotient der Diffusionskoeffizienten einbezogen wird. Bei der Penetrations-Theorie wird dieser als Wurzelterm modifiziert und bei der Oberflächenerneuerungstheorie wird der Exponent des Quotienten angepasst.

Neben der Phasengrenze zwischen Gasblasen und Medium, erfolgt der Stofftransport über die Phasengrenze zwischen Medium und Zelle, in welcher die eigentliche Reaktion stattfindet. In Abbildung 6 ist das entsprechende Schema von der Gasblase in die Zelle dargestellt. Dabei ist die Grenzfläche der Gasblasen über die Blasengrößenverteilung und jeweiliger Anzahl bestimmt und analog die Grenzfläche der Zellen von der Zellgröße, Zellform und Zelldichte. Bei den in dieser Arbeit eingestellten Zelldichten im Medium von $OD_{600nm} = 10$ kann von einer Zellanzahl von ca. $5 \cdot 10^{12}$ pro Milliliter ausgegangen werden. Die entsprechende Grenzfläche an Zellmembran übersteigt damit die Blasengrenzfläche um mehrere Größenordnungen. Dieses kann über eine vereinfachte Betrachtung quantifiziert werden. Vorgreifend wurden in dieser Arbeit Gasgehalte von bis zu 10 % erreicht. Dieses bedeutet, dass bei 2 Liter Medium im Begasten Zustand 200 ml Gas in Form von Gasblasen im Medium dispergiert sind. Nun kann für einen bestimmten Blasendurchmesser bei ideal sphärischer Form (Kugel) über das Volumen die Anzahl der Gasblasen berechnet werden, welche Volumenäquivalent zu den 200 ml Gasgehalt sind. Mit der Kugeloberfläche kann nun die Gesamtoberfläche aller Gasblasen berechnet werden. Dieses Beispiel vernachlässigt, dass stets eine

Blasengrößenverteilung vorliegt und nicht alle Gasblasen den gleichen Durchmesser besitzen reicht für die sich daraus ergebene Quintessenz jedoch vollkommen aus. Analog zur Berechnung der Oberfläche der Gasblasen kann nun die Oberfläche der Zellen abgeschätzt werden. Bei der in dieser Arbeit durchschnittlich eingesetzten optischen Dichte von $OD_{600nm} = 10$ enthält 1 ml ca. $5 \cdot 10^{12}$ Zellen. Zusätzlich kann vereinfacht angenommen werden, dass diese ideal kugelförmig mit ca. 1 μm Durchmesser vorliegen. Über das Mediumvolumen kann auf die Gesamtzellzahl und über die Kugeloberfläche bei 1 μm Durchmesser auf die Gesamtoberfläche aller Zellen geschlossen werden.

Tabelle 2 : Abschätzung der Oberfläche aller Gasblasen und der Oberfläche aller Zellen für verschiedene Blasendurchmesser; Annahme das die Zellen ideal kugelförmig mit 1 μm Durchmesser vorliegen und auch die Blasen ideal kugelförmig sind.

Parameter	Wert	Einheit
Gasgehalt Blasensäule	10	%
Volumen Blasensäule	2	[L]
Volumen Gasgehalt	0,0002	[m ³]
Optische Dichte bei 600nm	10	[-]
Zellen pro OD_{600nm}	5,10E+11	[mL ⁻¹]
Zellen bei 2 L und $OD_{600nm} = 10$	1,02E+16	[-]
Durchmesser Zelle (ca.)	1	[μm]
Oberfläche einer Zelle	3,1415E-10	[m ²]
Zelloberfläche im Reaktor	3204330	[m ²]

Blasendurchmesser		Volumen einer Blase	Anzahl Gasblasen	Oberfläche Gasblasen	Oberfläche Zelle/ Oberfläche Gasblasen
[μm]	[m]	[m ³]	[-]	[m ²]	[-]
10	0,0001	5,24E-13	381983129	12	267028
20	0,0002	4,19E-12	47747891	6	534055
50	0,0005	6,54E-11	3055865	2,4	1335138
100	0,001	5,24E-10	381983	1,2	2670275
200	0,002	4,19E-09	47748	0,6	5340550
300	0,003	1,41E-08	14148	0,4	8010825
400	0,004	3,35E-08	5968	0,3	10681100
500	0,005	6,54E-08	3056	0,24	13351375
1000	0,01	5,24E-07	382	0,12	26702750
2000	0,02	4,19E-06	48	0,06	53405500

Relevanter Bereich

In Tabelle 2 ist diese theoretische Rechnung entsprechend mit Einheiten für verschiedene Blasendurchmesser aufgeführt. Zudem wurde der Quotient aus Gesamtoberfläche der Zellen und Gesamtoberfläche der Gasblasen gebildet. Dabei wird deutlich, dass für alle in dem verwendeten Reaktorkonzept relevanten Blasengrößen (ca. 50 – 500 μm) die Oberfläche der

Zellen signifikant um mehrere Größenordnungen höher liegt als die Oberfläche der Gasblasen. Der entsprechende Quotient ist dabei so groß, dass alle realistischen Änderungen der Grundannahmen, keine Änderung hin zu einer Situation bewirken, bei der die Oberfläche der Gasblasen nahezu gleich oder größer ist als die der Zellen.

Eine entsprechende Stofftransportlimitierung über die Zellmembran kann bei dieser Zelldichte ausgeschlossen werden, da sich spezifische Parameter wie Transportwiderstandskoeffizienten in weitaus geringem Maße unterscheiden. Das über die Zellmembran diffundierte Butan, wird innerhalb der Zelle dann vom Enzymsystem zur Buttersäure oxidiert. Aufgrund des oben durchgeführten Rechenbeispiels kann nicht der Transport über die Zellmembran, sondern nur die Umsetzung durch das Enzymsystem limitierend sein. Dabei bestimmt der limitierende Mechanismus die Höhe der messbaren Butanaufnahmerate, falls ausreichend Butan ins Medium eingetragen wird. Abbildung 6 zeigt den schematischen Stofftransport als Übersicht von der Gasblasen über das Medium zum Enzymsystem in der Zelle.

Unter der Annahme, dass die Butanaufnahmerate also die Aktivität der Zellen (BUR – Butane Uptake Rate) größer ist als der eingetragene Butanstrom ergibt sich damit folgende Vereinfachung (T04) zur Abschätzung der Butantransferate. So kann die Konzentration von im Medium gelösten Butan als nahezu null angenommen werden und so über das Produkt der maximalen Löslichkeit c^* und dem k_{La} -Wert der Butaneintrag abgeschätzt werden.

$$\text{Wenn } BUR \gg BTR \text{ folgt } BTR = k_{La} \cdot y_i \cdot p_{ges} \cdot H^{cp} \cdot \text{EXP} \left(C \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right) \quad [\text{T04}]$$

4.1.2 Beschreibung von Blasenströmungen

Blasensäulenreaktoren und Blasenströmungen allgemein sind seit Mitte des 20. Jahrhundert Gegenstand der Forschung. Dabei wurden auf Basis empirischer Daten aber auch durch diverse Modellierungen mit allgemeinen Parametern verschiedenste Approximationen des Stoffüberganges und anderer charakteristischer Kennzahlen formuliert. Dabei kann anhand einer einzelnen Blase deren Aufstieg in einer Flüssigkeitssäule beschrieben werden.

Auf eine Gasblase innerhalb eines Mediums wirken verschieden Kräfte, welche Einfluss auf die Strömungsrichtung und Geschwindigkeit haben. Im Folgenden werden die zugrundeliegenden Mechanismen beschrieben. Bei der in dieser Arbeit betrachteten Gasmischungen hat die Mischung mit 20 % v/v Butan und 80 % v/v Luft die höchste Dichte mit $1,55 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Das umgebene Medium besteht unter Vernachlässigung der geringen Salzkonzentration nur aus

Wasser und hat somit bei 30 °C ein Dichte von 995,65 kg·m⁻³. Aufgrund dieses signifikanten Dichteunterschiedes wird auf die Blasen eine entsprechende Auftriebskraft F_A [N = kg·m·s⁻²] wobei diese proportional zum Volumen V_{Blase} [m³] ist. Weiter fließt die Dichtedifferenz $\Delta\rho$ [kg·m⁻³] und die Fallbeschleunigung g [m·s⁻²] ein.

$$F_A [N] = g \cdot \Delta\rho \cdot V_{Blase} = g \cdot (\rho_{Medium} - \rho_{Gas}) \cdot \frac{4}{3} r_{Blase}^3 \quad [T05]$$

Der Radius r [m] der Blase geht damit kubisch in die Berechnung der Auftriebskraft ein. Zusätzlich wirkt auf die Blase eine Widerstandskraft, welche durch die Strömung des umgebenden Mediums verursacht wird. Steigt die Blase nach oben und die Flüssigkeitsströmung ist herabgerichtet mit der Geschwindigkeit v_{Medium} [m·s⁻¹] ist auch die Widerstandskraft F_W [N] die auf die Blase wirkt herabgerichtet und damit entgegengesetzt zur Auftriebskraft. Die Widerstandskraft ist auch proportional zur Blasengröße, jedoch geht nicht das Volumen, sondern die Projektionsfläche der Blase als Widerstandsfläche A [m²] der Strömung in die Berechnung mit ein. Sie setzt sich aus einem für das betrachtete System spezifischen Widerstandsbeiwert c_W [-], dem Ausdruck für den Staudruck und der Widerstandsfläche wie folgt zusammen.

$$F_W = c_W \cdot \frac{1}{2} \cdot \rho_{Medium} \cdot v_{Medium}^2 \cdot A = c_W \cdot \frac{1}{2} \cdot \rho_{Medium} \cdot v_{Medium}^2 \cdot \pi \cdot r_{Blase}^2 \quad [T06]$$

Die Projektionsfläche einer Blase kann damit bei sphärisch-kugelförmigen Blasen als Kreis angenähert werden und der Radius geht damit quadratisch in die Berechnung der Widerstandskraft ein. Betrachtet man beide Effekte zusammen, steigt mit steigendem Blasenradius die Auftriebskraft proportional schneller als die Widerstandskraft. Für eine Blase mit definiertem Radius kann somit eine entsprechende herab gerichtete Strömungsgeschwindigkeit u berechnet werden, ab der die Widerstandskraft gleich groß wie die Auftriebskraft ist.

In diesem Sonderfall würde die Blase weder aufsteigen noch mit der Strömung hinabgetrieben werden. Ist durch die Strömung die Widerstandskraft größer als die Auftriebskraft, wird die Blase mit der Flüssigkeitsströmung in Strömungsrichtung getrieben. Im laminaren Fall kann über die Stokes-Gleichung die Widerstandskraft mit der dynamischen Viskosität des Mediums η_{Medium} [Pa·s = kg·m⁻¹·s⁻¹] wie folgt vereinfacht werden.

$$F_{W,Stokes} = 6 \cdot \pi \cdot \eta_{Medium} \cdot v_{Medium} \cdot r_{Blase} \quad [T07]$$

Dieser Effekt tritt teilweise bei Air-Lift Reaktoren auf und führt dazu, dass Gasblasen im Downcomer nach unten geführt werden. Für turbulente Systeme, bei denen die Stokes-Gleichung nicht anwendbar ist, muss der Widerstandsbeiwert experimentell ermittelt werden. In einer idealen Blasensäule steigen die Blasen auf und das Medium strömt entsprechend zwischen den aufsteigenden Blasen. In diesem Fall lässt sich die Aufstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Blasendurchmessers bestimmen. In der Literatur sind für den in dieser Arbeit relevanten Bereich des Blasendurchmesser von abgeschätzten 0,5 - 2 mm mit Aufstiegsgeschwindigkeiten von $4 - 15 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ angegeben [31] [28]. Damit befinden sich die Blasen im sphärischen Bereich, liegen also idealisiert kugelförmig vor. Durch Zusetzen von Stoffen wie Salzen, Puffern und Zellen werden zudem die Blasengröße und die davon abhängigen Parameter beeinflusst. Neben der Betrachtung einer einzelnen Blase ist für einen Prozess die Betrachtung einer Blasenströmung interessanter, bei der eine Vielzahl von Gasblasen eine höhere Grenzfläche und damit einen höheren Stofftransport zur Folge hat. Dabei kommt es je nach Blasengröße, Stoffsystem, Blasensäulendurchmesser und Leerrohrgeschwindigkeiten bzw. Gasgehalten zu unterschiedlichen Strömungsbereichen. Bei kleineren Blasendurchmessern und geringen Gasgehalten liegt ein homogenes Strömungsbild vor. Mit größeren Blasendurchmessern und höheren Gasgehalten kann es zu einem heterogenen Strömungsverhalten kommen, u.a. bedingt bei Großblasen durch deutlich von der sphärischen Form abweichenden Geometrien. Diverse Arbeiten haben die Charakterisierung dieser Blasenströmungsbereiche untersucht und die entsprechenden Prozessfenster für verschiedene Stoffsysteme eingegrenzt. Für die in dieser Arbeit mit einem Sinterzylinder ($2 \mu\text{m}$ Porendurchmesser) produzierten Gasblasen von ca. 0,5 mm – 2 mm Durchmesser und einem Gasgehalt von maximal 8 % ist für alle Versuche ein homogenes Blasenregime vorliegend [29]. Weiter finden sich vielzählige Abschätzungen des $k_L a$ -Wertes bzgl. der Leerrohrgeschwindigkeit oder dem Gasgehalt für verschiedene Stoffsysteme. Besonders der Einfluss des Innendurchmessers der Blasensäule ist entscheidend bei einer Skalierung. So ist je nach Literaturquelle ab 15 cm – 20 cm Blasensäuleninnendurchmesser das untersuchte System mit geringen Einschränkungen auf größere Maßstäbe übertragbar. Im kleineren Maßstab unter 20 cm kommt es durch die auftretenden Wandeffekte zu Besonderheiten, welche eine Skalierungsabschätzung nur bedingt ermöglichen [16]. Weiter wurden durch die Weiterentwicklung von bildgebenden Verfahren eine bessere Abbildung und Beschreibung der Blasenströmungen möglich.

Verschiedene Modellierungsansätze erlauben dabei die immer präzisere Voraussage von Blasenströmungen, Stofftransport und Reaktionen in Blasensäulenreaktoren [32, 34, 45, 51]. Neben empirischen Gleichungen zur Beschreibung vom Stoffübergang und Strömungsparametern in Blasensäulen wurden zudem mathematische Modelle erstellt und validiert, um eine Übertragbarkeit in andere Systeme zu ermöglichen. Diverse Arbeiten weisen darauf hin, dass gewisse Grundvoraussetzungen erfüllt werden müssen, um ein Blasensäulenkonzept zu skalieren oder mathematische Voraussagen treffen zu können. Zum einen sollte ein minimaler Innendurchmesser von $> 15 \text{ cm} - 20 \text{ cm}$ vorliegen. Der Durchmesser geht quadratisch in die Fläche und damit auch über die Höhe in das Volumen ein, jedoch nur einfach in den Umfang und damit in die Oberfläche. Bei kleinen Durchmessern ist somit das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen deutlich größer als bei großen Durchmessern. Ein Einfluss von Wandeffekten an der Reaktoroberfläche wirkt sich somit bei kleinen Durchmessern signifikanter aus als bei großen Durchmessern. Daten aus Blasensäulenversuchen mit Durchmessern von $< 15 \text{ cm}$ sind somit nur bedingt geeignet für eine Skalierung. Weiter sollte der Lochdurchmesser des Begasungsadapters größer als $1 - 2 \text{ cm}$ sein, da besonders Blasenströmungen mit Kleinstblasen $\ll 1 \text{ cm}$ schwer zu beschreiben sind. Weiter sollte das H/D -Verhältnis (Höhe zu Durchmesser im unbegasteten Zustand) größer als 5 sein. Unter Skalierungsbetrachtungen wäre dabei die Einhaltung dieser Mindestwerte sinnvoll. Im Labormaßstab, besonders bei der Etablierung einer fermentativen Oxidation von Butan, ist die Einhaltung dieser Kriterien nicht möglich. Um in relevante Strömungsbereiche zu gelangen, sind gewisse Leerrohrgeschwindigkeiten notwendig. Bei Luft in Wasser wird der Übergangsbereich von homogener zu heterogener Strömung bei etwa $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ erreicht. Über den Innendurchmesser lässt sich damit die Begasungsrate ermitteln, welche für diese Leerrohrgeschwindigkeit dem Reaktor zugeführt werden muss. Während die Begasung mit Luft über entsprechende Hausleitungen im Labor nahezu beliebig erhöht und aufrecht gehalten werden kann, ist die Begasung mit Butan-Luft-Gemischen eingeschränkt. Zum einen kann aus Sicherheitsgründen nur ein definierter Abgasstrom in den Laborabzug eingeleitet werden, zum anderen ist aufgrund des vergleichsweise geringen Gasflaschenfülldrucks die Versuchsdauer bei hohen Begasungsraten deutlich eingeschränkt. Bei den höchsten in dieser Arbeit verwendeten Begasungsraten von $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ Leerrohrgeschwindigkeit bei 8 cm Innendurchmesser) liegt die maximale Versuchsdauer bei ca. 4 Stunden. Würde der Innendurchmesser mit 15 cm gewählt und die gleiche Leerrohrgeschwindigkeit von $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$

angestrebt, wäre die Versuchsdauer durch die erhöhte Begasungsrate von ca. $5,3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ durch die Gasflasche auf ca. 70 min limitiert. Eine Prozessetablierung mit größerem Blasensäulendurchmesser ist mit den verwendeten Mischgasflaschen somit kaum möglich. Eine bereits geplante Alternative ist die Verwendung einer Gasmischstation (vgl. Kapitel 8). Durch die Verwendung eines kleinen Blasensäulendurchmessers können mit den Mischgasflaschen adäquate Versuchszeiten von 4 – 18 Stunden realisiert werden. Zudem ist die Bereitstellung der erforderlichen Menge an Zellen im Labormaßstab gut zu realisieren. Die Verwendung eines Sinterzylinders mit $2\mu\text{m}$ Porengröße ist für das Skalierungspotential der Blasenströmungen nachteilhaft, ermöglicht aber deutlich mehr kleine Gasblasen und damit eine große Oberfläche aller Gasblasen. Dieses resultiert in einem vergleichsweise hohen k_{La} -Wert schon bei geringen Begasungsraten. Das verwendete Reaktorkonzept erlaubt daher eine Etablierung und Charakterisierung des Systems. Für weitere Betrachtungen des Prozesses sollte eine Skalierung in einen Reaktor erfolgen, welcher die Voraussetzungen bzgl. Innendurchmesser und Lochdurchmesser der Begasungseinheit für eine Skalierbarkeit besser erfüllt. Hier können weitere Effekte untersucht werden, welche Einfluss auf die Performance der Blasensäule haben. Verschiedene Strömungsbereiche von laminar bis turbulent, Rückvermischung sowie radiale und axiale Gradienten können im vorliegenden Reaktorkonzept kaum untersucht werden, sind jedoch Gegenstand aktueller Forschung.

4.2 Reaktionssystem – fermentative Oxidation mittels AlkBGT

Im Folgenden werden das AlkBGT Reaktionssystem und dessen Verwendung zur fermentativen Oxidation von gasförmigen n-Butan beschrieben. Die Substrate Butan und Sauerstoff werden durch eine Begasung über die Gasblasen ins Medium transportiert und dort von den Zellen aufgenommen. Zum Einsatz kommt dabei ein *E. coli* W3110 als Wirtsorganismus, wobei das Enzymsystem AlkBGT über ein Plasmid pBT10 integriert wurde. Die Plasmidkarte ist im Anhang 39 gezeigt [56]. Dabei ist eine Antibiotikaresistenz ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Kanamycin) und ein entsprechend Dicyclopropylketon-sensitiver (DCPK) Promoter vorhanden. Die Zellen benötigen zudem Glukose für den Erhaltungsstoffwechsel und die Kofaktorregenerierung innerhalb des Enzymsystems zur Oxidation des Butans (vgl. 4.2.1). Bevor die Zellen zur Oxidation eingesetzt werden können, müssen diese in für die Versuchsbedingungen notwendiger Menge vorliegen. Dabei können zwei Bereiche der Zellhandhabung unterschieden werden. Zum einen die Anzucht der Zellen, um möglichst viele Zellen zu generieren und diese bei ausreichender Zelldichte optimal zu induzieren, um so eine

möglichst optimale Expression der Zielenzyme zu gewährleisten. Hierbei können durch eine Hochzelldichtefermentation mit Zulaufverfahren entsprechend hohe Zelldichte erreicht werden, welche weiter unter kontrollierten Bedingungen induziert werden können. Nach dem Abtrennen der Zellen vom Medium kann dann eine Lagerung bzw. eine Verwendung der Zellen in der Alkanoxidation stattfinden. Dabei ist darauf zu achten, die Oxidation so einzustellen, dass die Zellen ruhend vorliegen, also durch gezielte Limitation kein Wachstum möglich ist. Dieses wird meist durch den Einsatz von Minimalmedium und geringen Glukosezufuhraten realisiert.

4.2.1 AlkBGT Monooxygenasensystem

Im Folgenden wird das AlkBGT Monooxygenase Reaktionssystem beschrieben. Dieses Enzymsystem wurde als Modellsystem ausgesucht, da es in Vorversuchen in einem *E. coli* Wirt exprimiert hohe Butanaufnahmeraten gezeigt hatte. Das Enzymsystem kommt ursprünglich aus *Pseudomonas oleovorans* GPo1, einem ölabbauenden Bakterium, welches auf Alkanen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Dabei sind die für den Abbauprozess verantwortlichen Enzyme bzw. die entsprechend kodierenden Gene AlkBFGHJKL und AlkST von Interesse. Die Oxidation des Alkanes zum Alkanol wird durch das AlkBGT Hydroxylase System katalysiert, welches aus drei Enzymkomponenten besteht. Bei der Oxidation werden zuerst von der Rubredoxin Reduktase AlkT ausgehend zwei Elektronen durch die Reduktion von NADH über das Rubredoxin AlkG zum in der Cytoplasmamembran gebundenen Monooxygenase (AlkB) transportiert (vgl. Abbildung 6). Dieses aktiviert eine endständige Kohlenstoff-Wasserstoff Bindung des Alkanes und oxidiert diese zum Alkanol durch die Einbringung eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff. Nachfolgend wird das Alkanol mittels der Dehydrogenase AlkJ zum Aldehyd umgesetzt, woran sich ein weiterer Oxidationsschritt zur Alkansäure durch die Aldehydedehydrogenase AlkH anschließt. Die weiteren Enzyme dieses Enzymsystems dienen der weiteren Verstoffwechslung bzw. beeinflussen die Aufnahme von längerkettigen Alkanen. Wird nur das AlkBGT Enzymsystem in einem Wirt entsprechend eingebracht, ohne das Vorhandensein der Alkohol- bzw. Aldehyd-Dehydrogenase kommt es trotzdem zur Akkumulation der Alkansäure, da das AlkBGT System zur Überoxidation neigt, also sowohl das Alkan als auch das Alkanol und das Alkanal als Substrat umsetzt. Für die Reaktion mit gasförmigen n-Butan als Substrat bedeutet dieses, dass sich entsprechend analog Buttersäure akkumulieren wird und Butanol bzw. Butanal nur als Intermediate bzw. in Spuren zu finden sind. Weiter ist bei der Verwendung von

membrangebundenen Proteinen darauf zu achten, dass die entsprechende Expression des AlkB Enzymes kontrolliert abläuft. Eine zu hohe Expression führt dabei zu vielen AlkB Enzymen, die sich wiederum vielzählig in die Cytoplasmamembran integrieren und so zur Destabilisierung beitragen. Eine optimale Induktorkonzentration und Expressionszeit sind deshalb entscheidend für die spezifische Aktivität des Enzymsystems bzw. der Zellen. Diese und weitere Informationen sind [6] [9] [41] und [10] zu entnehmen.

4.2.2 Volumetrische Produktivität & Ausbeute

Die volumetrische Produktivität ist die Kenngröße für die Produktivität eines Prozesses bezogen auf eine definierte Volumeneinheit. Sie ist für eine Skalierbarkeit gut zugänglich, da durch die Multiplikation mit dem Prozessvolumen die Gesamtproduktivität einfach berechnet werden kann. Dieses setzt voraus, dass der Prozess und die volumetrische Produktivität sich bei einem Scale-up entsprechend nicht signifikant ändern. Sind entsprechende Einschränkungen bekannt, ist eine Skalierung ggf. nicht akkurat. Zur Approximierung einer Skalierung ist die volumetrische Produktivität gut geeignet. Dabei wird die zeitliche Änderung der Stoffkonzentration betrachtet und durch geeignete Regression approximiert. Für das in dieser Arbeit verwendete Reaktionssystem wurde die zeitliche Änderung (t_0 bis t) der Buttersäurekonzentration ($c_{BuCOOH,0}$ bis $c_{BuCOOH}(t)$) durch lineare Regression angenähert. Die volumetrische Produktivität lässt sich deshalb mittels Gleichung T07 bestimmen.

$$P_{vol} = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - t_0) \cdot (c_{BuCOOH,i} - c_{BuCOOH,0})}{\sum_{i=1}^n (t_i - t_0)^2} \quad [T08]$$

Die Ausbeute [%] setzt die Menge an hergestelltem Produkt ins Verhältnis mit der Menge an ins System eingesetzten Menge an Substrat. Für eine Reaktion bei der die beiden Substrate Butan und Sauerstoff gasförmig vorliegen und der Volumenstrom der Begasung konstant ist, kann die Ausbeute als Quotient aus der volumetrische Produktivität P_{vol} [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$] und dem volumetrischen molaren Strom an Butan in den Reaktor formuliert werden. Dazu wird der Volumenstrom des Gases \dot{V} [$\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$] mit dem Molenbruch von Butan y_{Bu} [-] und dem Systemdruck [bar] auf den reinen Volumenstrom an Butan umgerechnet. Mit der allgemeinen Gaskonstante R [$\text{bar} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$], dem Druck p [bar] und der Temperatur ergibt sich das molare Volumen V_m [$\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$]. Mit diesem kann nun vom Volumenstrom von Butan auf die zeitlich eingetragene Molmenge an Butan im Nenner geschlossen werden. Dieser molare Butanstrom kann nun auf das Reaktionsvolumen V_R [m^3].

$$Y_{BuCOOH}[\%] = \frac{P_{vol}}{\dot{V} \cdot p \cdot y_{Bu} \frac{1}{V_m} (t_i - t_0) \cdot \frac{1}{V_R}} \cdot 100\% = \frac{P_{vol}}{\dot{V} \cdot y_{Bu} \frac{p}{R \cdot T} \cdot \frac{1}{V_R}} \cdot 100\% \quad [T09]$$

4.3 Sicherheitsaspekte im Umgang mit Butan/Luft-Gemischen

Bei der Oxidation von Butan mit dem hier verwendeten Reaktionssystem müssen sowohl Sauerstoff und Butan ins Medium eingetragen werden. Bei den verwendeten Prozessbedingungen liegen die beiden Substrate gasförmig vor und werden auch in diesem Aggregatzustand in den Reaktor geleitet und verlassen diesen auch anteilig wieder im gasförmigen Zustand. Dabei wird aus technischen Gründen ein Gemisch von Butan mit synthetischer Luft verwendet, wobei letztere aus 21 % v/v Sauerstoff und 79 % v/v Stickstoff gemischt wird. Wird reines Butan mit Luft gemischt erfolgt eine Verdünnung des Butans entlang der in Abbildung 7 eingezeichneten roten Luft-Mischungslinie. Butan bildet mit Luft in einem bestimmten Mischungsbereich ein explosives Gemisch, wobei dieser Bereich über die untere Explosionsgrenze und die obere Explosionsgrenze gekennzeichnet wird. Bei Umgebungsdruck liegt die untere Explosionsgrenze (UEG) bei 1,4 % v/v von Butan in Luft. Die obere Explosionsgrenze liegt bei 9,4 % v/v. Unterhalb und oberhalb dieses Bereiches ist ein Gemisch aus Butan und Luft nicht zündfähig. Dabei ändern sich UEG und auch OEG mit dem Systemdruck. Besonders die obere Explosionsgrenze steigt mit steigendem Druck an. Für die in dieser Arbeit betrachteten Druckbereiche mit Systemdrücken von 1,1 – 1,5 bar abs. ist die druckabhängige Verschiebung der Explosionsgrenzen jedoch vernachlässigbar gering. Aus sicherheitstechnischen Gründen ist deshalb stets zu gewährleisten, dass die Reaktoratmosphäre außerhalb der Explosionsgrenzen (markierte Fläche) liegt. Theoretisch könnte die Reaktion mit weniger als 1,4 % v/v Butan im Mischgas durchgeführt werden, jedoch ist dabei der Partialdruck so gering, dass der daraus resultierende Konzentrationsgradient (vgl. 4.1.1) respektive Stofftransport ins Medium vergleichsweise gering ausfällt. Eine Mischung sollte deshalb oberhalb der OEG liegen, wobei ein Mindestabstand von 4 % v/v aus sicherheitstechnischen Gründen eingehalten wurde. Der geringste Butangehalt ist damit auf 14 % v/v begrenzt. Dieser Sicherheitsabstand entspricht dabei einer Zumischung von Luft in Höhe von 40 % des Volumenstromes des Butan-Luft-Gemisches berechnet über die sich dabei ergebene Gesamt Mischung. Sollte ein Gasstrom mit 14 % v/v durch den Reaktor geführt werden, würde sich dabei erst bei einer ungeplanten Zumischung von zusätzlich 40 % Luft ein explosives Gesamtgemisch einstellen.

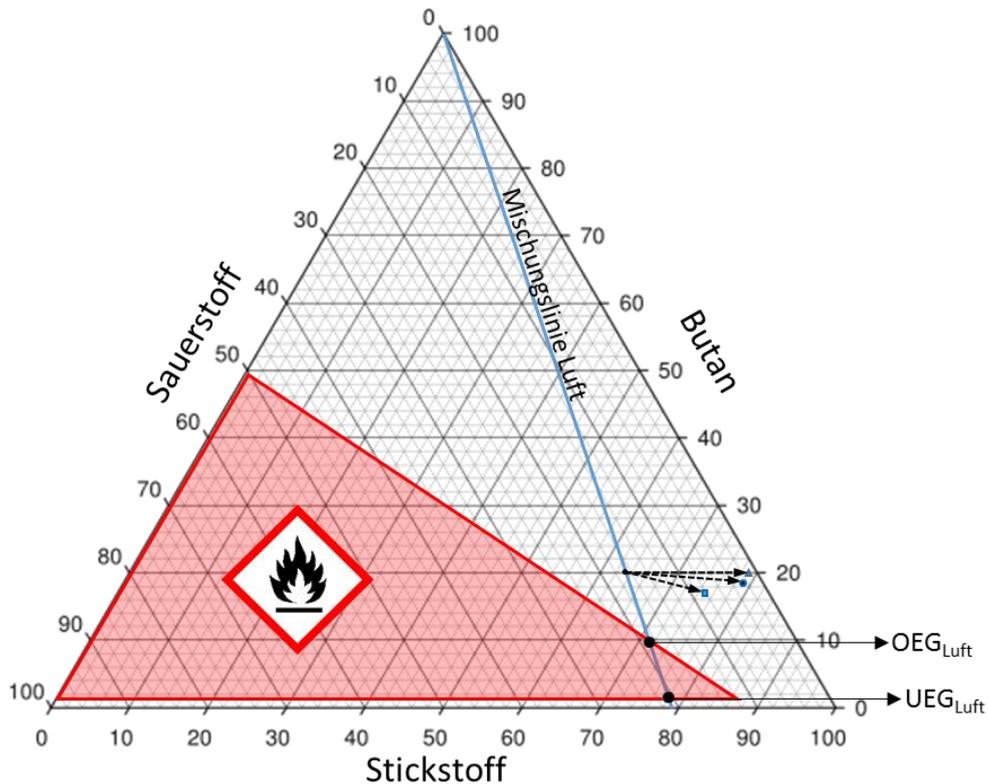


Abbildung 7 : Explosionsdiagramm Butan-Sauerstoff-Stickstoff, UEG von Butan in Luft bei 1,4 % v/v und OEG bei 9,4 % v/v. Je nach Stöchiometrie von Butan zu Sauerstoff erfolgt eine Verschiebung entlang der eingezeichneten Pfeile; 1:2 – Quader; 1:3 – Kreis; 1:4 – Dreieck;

Da während der Reaktion Sauerstoff und Butan abreagieren, verändert sich die Gaszusammensetzung im Reaktor bzw. im Abgasstrom. Dabei erfolgt die Oxidation von Butan zur Buttersäure über drei Oxidationsschritte (vgl. 4.2.1), wobei bei jedem Schritt ein Sauerstoffmolekül benötigt wird. Bei der Reaktion tritt also keine stöchiometrische Abnahme von Butan und Sauerstoff auf, sondern es wird mindestens 3-mal so viel Sauerstoff verbraucht wie Butan. Zudem kommt es durch die Zellatmung zu einem zusätzlichen Verbrauch an Sauerstoff. Sollte es zu einer Reaktion kommen, verschiebt sich, berechnet über die Stoffbilanz, der zugehörige Punkt der Gaszusammensetzung. Diese Verschiebung ist in Abbildung 7 für verschiedene Stöchiometrien dargestellt. Stickstoff als inerte Komponente ist nicht an der Reaktion beteiligt. Im Diagramm wird als Beispiel eine Begasung mit 20 % v/v Butan und 80 % v/v Luft (63,2 % v/v Stickstoff und 16,8 % v/v Sauerstoff) als Ausgangspunkt gezeigt. Eine Abreaktion von 20 % des Butans resultiert bei einer Butan-Sauerstoff-Stöchiometrie von 1:3 in einem Endgemisch mit 19,0 % Butan, 5,7 % Sauerstoff und 75,2 % Stickstoff (Kreis). Bei einer Stöchiometrie von 1:2 (Quader) und 1:4 (Dreieck) verschiebt sich das resultierende Gasgemisch im Dreiecksdiagramm entsprechend. Die Reaktion bewirkt also eine Verschiebung im Explosionsdiagramm weg vom Explosionsbereich. Dabei ist es

sicherheitstechnisch sinnvoll den Einsatz von Gassensoren und Gaswarnanlagen zu evaluieren. Die bei den Versuchen dieser Arbeit zum Einsatz kommende Sicherheitstechnik ist in Kapitel 5.1.3 detailliert beschrieben.

5 Material und Methoden

5.1 Reaktorkonzept und Konstruktion

Im Folgenden wird das Reaktorkonzept und die Konstruktion der einzelnen Bauteile bzw. deren Verschaltung innerhalb des Versuchsaufbaues erörtert.

5.1.1 Blasensäulenreaktor

Die verwendeten Blasensäulen bestehen aus einem Glashohlzylinder mit Doppelmantel zur Temperierung. Der Innendurchmesser beträgt dabei 8 cm mit einer Höhe von 60 cm. Dieses resultiert in einer Füllhöhe von 42 cm bei 2 L Flüssigkeit im blasenfreien Zustand (Kein Gasgehalt).

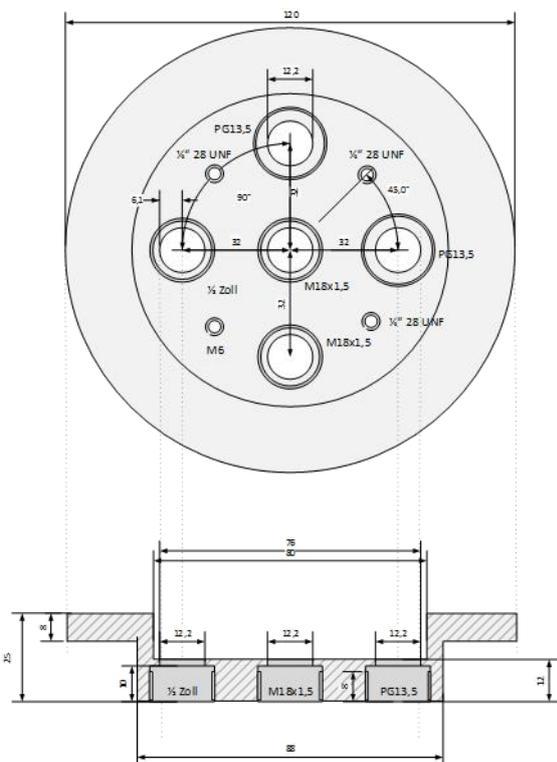


Abbildung 8 : Laboraufbau des 2 L Blasensäulenreaktors mit Doppelmantel zur Temperierung; Beigefarbenes Medium mit Zellen mit $OD_{600nm} = 15$; Konstruktionsplan des Bodenflansches mit Innengewinden zum Anschluss diverser Mess- und Zufuhr- und Probenahmesysteme

Beide Enden des Glasschusses enden mit einer Flanschaufnahme und sind darüber mit weiteren Armaturen verbindbar. Für den Boden der Blasensäule wurde dabei eine Flanschplatte mit becherförmiger Vertiefung konstruiert, welcher über eine zentrale M18x1,5

Feingewindebuchse verfügt. Um dieses zentrale Gewinde wurden gleichverteilt vier weitere Gewindebuchsen angeordnet, wobei jeweils zwei PG 13,5 Gewinde und M18x1,5 Gewinde ausgewählt wurden. Die Panzerrohrgewinde 13,5 sind dabei die Standardgewinde für das Verschrauben von Sauerstoff- und pH-Sonden und es ist diverses Zubehör anderer Hersteller verfügbar.

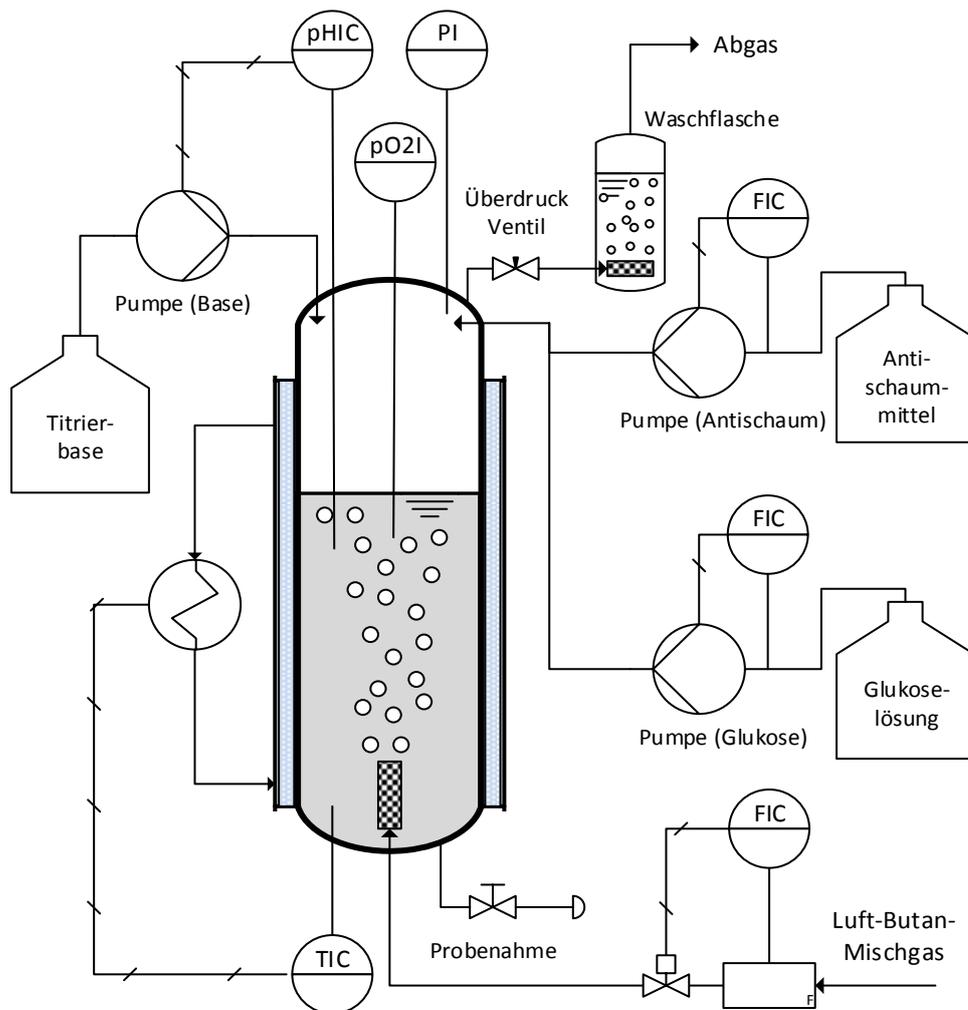


Abbildung 9 : R&I Fließbild des Blasensäulenreaktors;

Die Verwendung von M18x1,5 Feingewinden erlaubt die Einbindung von Fermenter-Zubehör anderer Hersteller (Eppendorf – DASGIP System), hat aber insbesondere den Vorteil, durch den Gewindeinnendurchmesser und die im Flansch bestehende Dichtfläche mit 12 mm zentraler Durchführung Silikon- und Teflon-beschichtete Septen von Typ GL 14 verwenden zu können. Zur Verbindung mit weiteren Systemen wurden zudem M18x1,5 Blindstopfen mit diversen Innengewinden gefertigt. Damit ist der Anschluss mit ¼ Zoll-28 UNF Feingewindeadaptern aus dem HPLC Bereich, sowie M6 Gewindeadaptern aus dem FPLC

Bereich möglich. Entsprechende Adapter mit 1/4-Zoll und 1/8-Zoll erlauben den Anschluss von 6 mm Klemmschlauchverbindern und weiterem Zubehör und erlauben damit in Zukunft auch die Erweiterung mit etwaigem Downstream-Equipment. Für den Deckelflansch wurde ebenfalls eine Flanschplatte konstruiert, wobei hier um ein zentrales M24x1,5 Feingewinde drei M18x1,5 Gewindebuchsen und drei PG 13,5 Gewindebuchsen angeordnet wurden. Die entsprechenden Konstruktionszeichnungen sind in Anhang 35 & Anhang 36 vorhanden und wurden aus 1.4301 Chrom-Nickel-Stahl gefertigt. Abbildung 8 zeigt die Blasensäule im Laborabzug mit angeschlossener Peripherie wobei Abbildung 9 das entsprechende Fließbild darstellt.

5.1.2 Prozesskontrollsystem

Zur Steuerung und Regelung der Prozessparameter sowie zum sicheren Betrieb der Blasensäule wurde ein spezialisiertes Kontrollsystem konstruiert und eine passende Bedienoberfläche (Abbildung 10) programmiert. Dabei kam als zentraler Baustein das Input-Output Basismodul Profimessage von Delphin Technologies aus Bergisch Gladbach zum Einsatz. Mit der dazugehörigen Software Profisignal wurde das Basismodul angesteuert und über einen schwenkbaren Monitor mit Touch-Funktion zusammen mit der erstellten Bedienoberfläche war eine intuitive Steuerung direkt am bzw. im Laborabzug, in unmittelbarer Nähe der Blasensäule möglich. Im Folgenden sind die Prozessparameter aufgelistet und ihre Funktion und Interaktion mit dem Kontrollsystem beschrieben. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde mittels polarographischer Sauerstoffelektrode (Mettler Toledo InPro 6800) gemessen und über einen Messverstärker (Meinsberg 3030) als 4-20 mA Signal an das Basismodul weitergeleitet. Die Sonde reicht dabei vom oberen Deckelflansch im unbegasteten Zustand 5 cm unter die Flüssigkeitsoberfläche. Eine Kalibrierung erfolgte durch Begasung mit Luftsauerstoff bzw. Stickstoff. Dabei wurde beim Erreichen des Gleichgewichtszustandes über die Bedienoberfläche im entsprechend hinterlegten Bedienfenster des zugehörigen R&I-Piktogramms der Sauerstoffwert zu 0 % bzw. 100 % bestätigt. Die Messung und Regelung des pH-Wertes wurde über eine pH-Elektrode (Mettler Toledo 405-DPAS-SC-K8S) realisiert. Diese wurde mit einem Messverstärker (Meinsberg MV 3010) verbunden und von dort der pH-Wert als 4 – 20 mA Signal an das Basismodul geleitet. Eine Kalibrierung erfolgte durch Eintauchen der Sonde in die entsprechend eingestellte Pufferlösung. Dabei wurde beim Erreichen des Gleichgewichtszustandes über die Bedienoberfläche im entsprechend hinterlegten Bedienfenster des zugehörigen R&I-

Piktogramms der pH-Wert zu pH = 7 und pH = 4 bestätigt. Mit einem auf der Bedienoberfläche auswählbaren Sollwert wurde dann eine entsprechende pH-Regelung integriert, welche über eine Schlauchpumpe (Watson Marlow SCI Q 400) bei Unterschreitung des Sollwertes den pH-Wert durch Zuführung von Ammoniakwasser (25 %) konstant hält. Die Begasung wurde über Mass Flow Controller (MFC) der Firma Bronkhorst (Typ EL-Flow Select) realisiert. Diese sind direkt analog über 4-20 mA Signale mit dem Basismodul verbunden. Das Signal des Massenflussmessgerätes wird dabei mit dem sich aus der Gaszusammensetzung ergebenden Konversionsfaktor verrechnet.

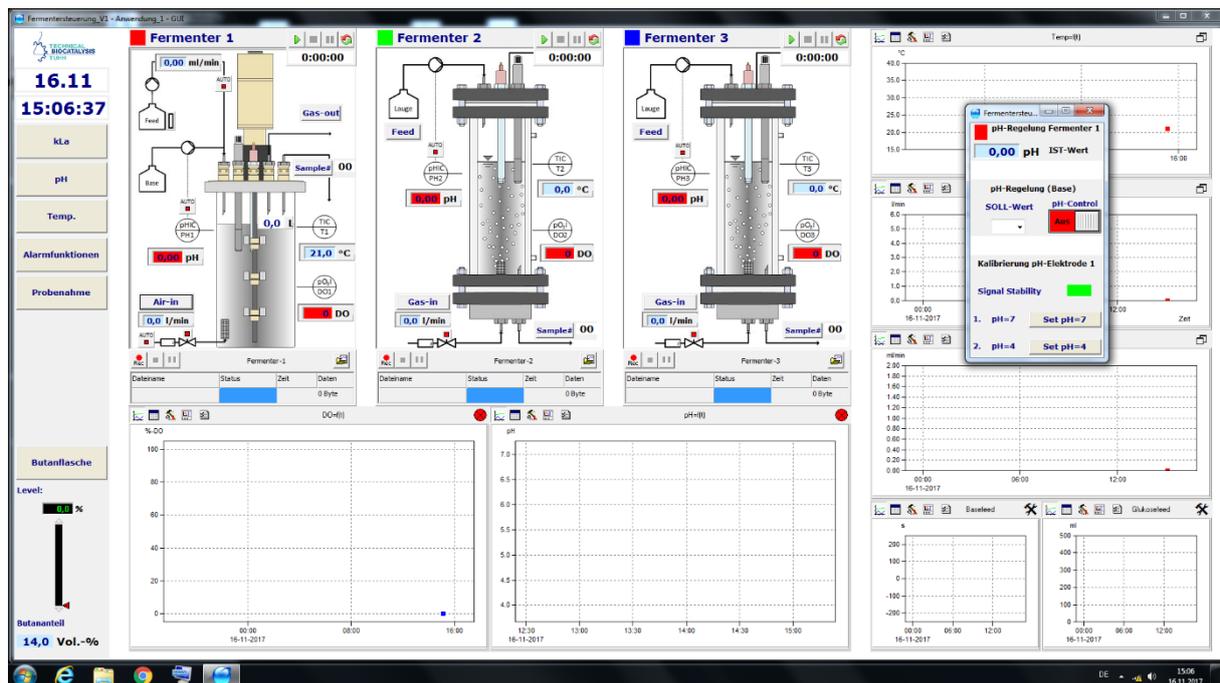


Abbildung 10 : Graphische Benutzeroberfläche für die Steuerung des 2,5 L Rührkesselreaktors (Hochzelldichte) und der zwei 2 L Blasensäulenreaktor zur Butanoxidation; Realisierung auf 24" Bildschirm auf Schwenkarm und integrierter „Touch-Funktion“

Dazu kann auf der Bedienoberfläche der Butananteil im Mischgas ausgewählt werden. Weiter wird der Druck gemessen und in die Rechnung einbezogen, um so einen möglichst exakten Istwert für den Gasvolumenstrom in der Blasensäule zu erhalten. Weicht dieser Istwert vom auf der Bedienoberfläche ausgewählten Sollwert ab, wird der Istwert über einen digitalen PI-Regler, welcher das Stellventil des MFCs ansteuert und entsprechend regelt. Der Druck wird über einen digitalen Druckaufnehmer im Kopfraum der Blasensäule gemessen und das analoge Ausgangssignal an das Basismodul geleitet und dort entsprechend zur Berechnung des Gastromes verwendet und der zeitliche Verlauf zusätzlich als Leakage-Indikator in der Benutzeroberfläche angezeigt. Durch den minimalen Überdruck von 100 mbar während der Versuche ist schon eine geringe Leakage im Kopfraum und/ oder nachfolgender Leitung

sichtbar. Auch bei der Probenahme ist durch das Aufziehen der Probenspritze und mehrmaligen Spülens des Probenahmeschlauches eine Druckschwankung zu verzeichnen, welche zur zeitlichen Zuordnung der GC offline Proben genutzt werden kann. Die Temperatur in der Blasensäule wird über den in die Sauerstoffelektrode integrierten Temperatursensor ermittelt, indem das Basismodul den entsprechenden Widerstand misst. Eine Kalibrierung erfolgte zuvor bei drei Temperaturen im versuchsrelevanten Bereich (20 °C - 50 °C). Die Temperaturregelung erfolgt wiederum über ein Umwälzthermostat, (Haake, Phönix II) welches an den Doppelmantel der Blasensäule angeschlossen ist. Hier ist es möglich auf entsprechende Solltemperaturen zu regeln oder Temperaturrampen zu integrieren. Die Zugabe von Antischaummittel (unverdünntes Delamex – Bussetti Co GmbH) und wässriger Glukoselösung (250 g·kg⁻¹ – 500 g·kg⁻¹) wird mittels Spritzenpumpen (WPI - World Precision Instruments; Aladin II) realisiert. Diese werden über Silikonschläuche mit dem Reaktor verbunden und hier über Gewindestopfen mit Silikonsepten mittels Kanülen in die Blasensäule geleitet.

5.1.3 Sicherheitsrelevante Einrichtungen

Bei der Begasung des Blasensäulenreaktors mit Butan-Luft-Mischgas sind verschiedene sicherheitsrelevante Aspekte zu berücksichtigen. Dabei können drei räumliche Bereiche unterschieden werden, welche aufgrund ihrer Funktion eine unterschiedliche Betrachtung voraussetzen. Die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten vorgemischten Gasflaschen werden im Gasflaschenschrank (Hersteller, Typ, Sicherheitsstufe) an die Gasentnahmeeinrichtung angeschlossen. Der Gasflaschenschrank stellt dabei den ersten räumlichen Bereich da. Da die verwendeten Butan-Luft Mischgasflaschen einen Maximaldruck von 11 bar aufweisen, ist innerhalb des Gasschranks kein Druckminderer verbaut. Die Flasche wird somit direkt an die Versorgungsleitung angeschlossen, wobei ein Absperrventil sowie ein Manometer und ein extra Notabschaltventil vorgeschaltet sind. Die sich davor befindliche Anschlusswendel kann über eine Spülleitung gespült werden. Der Gasflaschenschrank hat dementsprechend eine flexible Verbindung (Gasflasche-Anschlusswendel) und verfügt über einen Gasmesssensor (Hersteller Extox). Dieser ist mit einem zentralen Gaswarnsystem (Extox ET-8D) mit Notfallabschaltung verbunden und hat zwei Alarmgrenzen bei 20 % und 40 % der unteren Explosionsgrenze (UEG) von 1,4 % Butan (in Luft). Während die erste Alarmgrenze einen optischen Alarm (gelbe Warnblinklampen) auslöst, wird beim Erreichen der zweiten Alarmgrenze das Notabschaltventil im Gasflaschenschrank geschlossen und ein zusätzlicher

akustischer Alarm gestartet. Zudem wird im Falle eines Alarms eine Alarmkette eingeleitet. Dabei wird die Pförtnerloge (ständig besetzt) automatisch vom Gaswarnsystem mit einem entsprechenden Alarmcode informiert. Dieser wiederum ist eindeutig einem Notfallplan zugeordnet und leitet eine Informationskette theoretisch bis hin zur Feuerwehr ein. Der Gasflaschenschrank verfügt zudem über eine Luftabsaugung und würde im Fall einer geringen Leckage das austretende Butan absaugen. Vom Gasflaschenschrank führt eine fest installierte Rohrleitung zum Laborabzug. Dieser zweite räumliche Abschnitt wird durch einen Fachbetrieb gewartet und besitzt keinerlei flexible Verbindungen, weshalb hier eine Leckage ausgeschlossen werden kann.

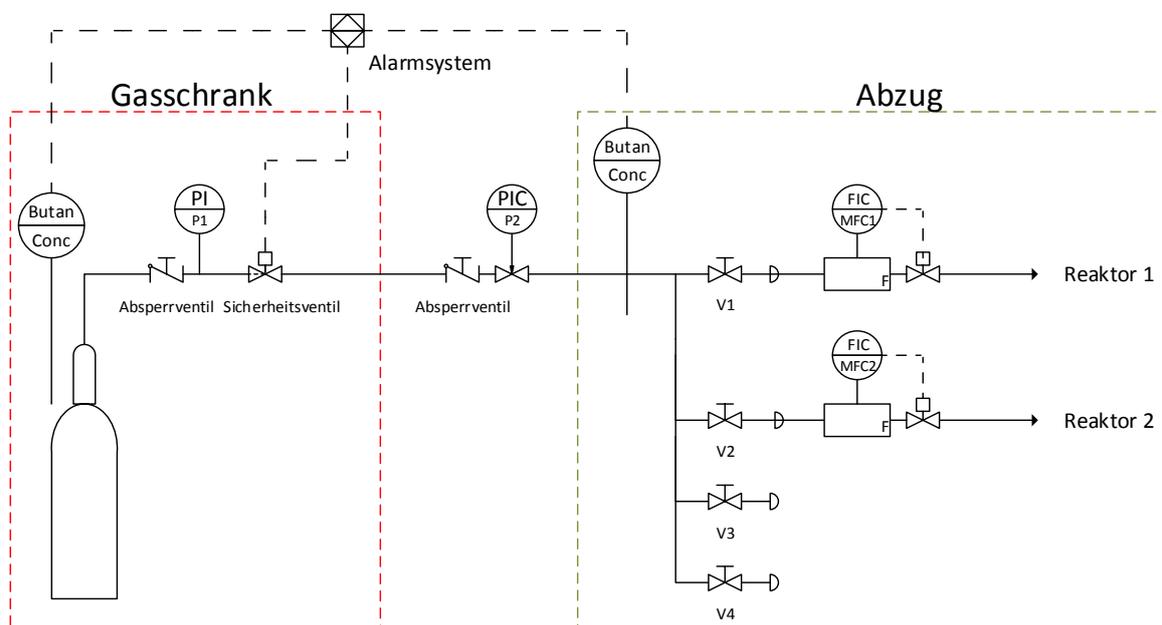


Abbildung 11 : R&I Fließbild der Gasversorgung vom Gasflaschenschrank zum Laborabzug mit Alarmsystem.

Vor den Eintritt in den Laborabzug ist dabei ein Druckminderer und ein Absperrhahn integriert, um in unmittelbarer Nähe zum Abzug eine Kontrolle der Gaszufuhr samt Vordruck zu ermöglichen. Mit dem fest installierten Eintritt in den Abzug beginnt der räumliche dritte Abschnitt, welcher wie zuvor der Gasflaschenschrank über einen baugleichen Gassensor verfügt. Auch dieser Gassensor ist an das Gaswarnsystem angeschlossen und leitet bei denselben Alarmgrenzen die oben beschriebene Alarmkette ein. Im Laborabzug endet die Rohrleitung in einem Verteilerblock, der die Verteilung auf vier weitere Abgänge ermöglicht, wobei jeder Abgang ein eigenes Absperrventil aufweist. Von diesem Ventil aus beginnt der flexible Teil der Gasleitungen. Die Verbindungen sind dabei mit 6 mm Steckverbindern ausgelegt und es wurden 6 mm (ID = 4mm) Polyurethanschläuche (PU) verwendet, um das Gas

zu den MFCs zu leiten. Den MFCs nachgeschaltet wird das Gas durch PU-Schläuchen zu einem Versorgungsblock am Boden der Blasensäule geleitet. Von hier erfolgt der direkte Anschluss der Blasensäule über kurze Versorgungsschlauchstücke (Silikon 6 mm, federummantelt) mit integriertem 0,2 µm Filter zur Steril-Filterung des Gases. Dieser ist am Bodenflansch der Blasensäule über einen 6 mm Steckerbinder fixiert, welcher in einen Sinterzylinder (2 µm Porennendurchmesser) innerhalb der Blasensäule endet (Begasungsadapter). Der Gasauslass der Blasensäule ist wiederum mit 6 mm Steckverbindern und 6 mm PU-Schläuchen realisiert und führt das Abgas durch eine Waschflasche direkt in das Abzugsrohr im oberen Teil des Laborabzuges. Der Laborabzug weist im Normalbetrieb einen Abluftstrom von $650 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ auf. Zur Berechnung der minimalen Verdünnung wurde der maximal in den Abzug einleitbarer Butanvolumenstrom zugrunde gelegt. Dieser ist im Normalbetrieb durch den MFC auf $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ begrenzt. Mit der maximalen Butankonzentration von 20 % v/v ergibt sich daraus ein maximaler Butanvolumenstrom von $36 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, welcher in den Abluftstrom des Abzuges eingeleitet wird. Daraus ergibt sich eine minimale Verdünnung von über 1:18000 im Normalbetrieb, was einer Konzentration von 0,0056 vol.-% entspricht. Dieses wiederum liegt um den Faktor 250 geringer als die untere Explosionsgrenze von 1,4 % v/v von Butan in Luft. Sollte die Funktion des Abzuges eingeschränkt vorliegen und sich Butan im Abzug akkumulieren, würde dieses durch den Gassensor registriert und entsprechend Alarm ausgelöst. Im Falle eines Stromausfalls im Labor schließen die Stellventile der MFCs automatisch, da diese im Normalzustand geschlossen (NC – normally closed) sind und das Kontrollsystem mit der Versorgungsspannung für die MFCs an der Laborstromversorgung hängt. Das Gaswarnsystem ist an die Notstromversorgung angeschlossen und funktioniert in diesem Fall als zweite Notabschalteinrichtung. Sollte auch die Notstromversorgung ausfallen schließt das Absperrventil im Gasflaschenschrank, da dieses ebenfalls als NC-Ventil vorliegt. Bei einer Leckage der Blasensäule oder der flexiblen Schlauchverbindungen entweicht das Butan in den Abzug und wird so durch den Abluftvolumenstrom verdünnt und abgeführt. Eine dadurch entstehende Zunahme des Butanvolumenanteils in der Abzugsluft auf Höhe der Arbeitsfläche im Abzug würde vom Gassensor registriert und die Konzentration an der Gaswarnanlage entsprechend angezeigt bzw. im Falle einer Grenzwertüberschreitung (20 % und 40 % der UEG) zu zuvor beschriebener Alarmkette führen. Generell wurde und wird empfohlen während der Experimente in regelmäßigen Abständen die gemessene

Butankonzentration an der Gaswarnanlage zu kontrollieren, um so etwaige Leckagen frühzeitig zu erkennen, bevor Alarm ausgelöst wird.

5.2 Analytik

5.2.1 Produktanalytik mittels GC

Zur Bestimmung der Buttersäurekonzentration im Medium wurde eine gaschromatographische Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Probe mit 500 µl Ethylacetat und 50 µl 3 M Salzsäure gemischt, welche zuvor in ein 2 ml Kunststoff-Reaktionsgefäß mit Sicherheitsdeckel vorgelegt wurden. Danach wurde für 2 min intensiv geschüttelt (gevortext). Weiter erfolgte eine Separation der Phasen durch Zentrifugation bei 13000 UPM für 3 min. Die Salzsäure dient dabei der Protonierung der Buttersäure und verbessert dadurch die Extraktion. In Vorversuchen ergab sich keine signifikant bessere Extraktion mit 6 M HCl, weshalb die Ansäuerung mit 50 µl HCl beibehalten wurde. Von der oberen organischen Ethylacetatphase wurden 170 µl entnommen und dabei darauf geachtet die Ausfällungen an der Interphase nicht aufzuwirbeln oder mit zu entnehmen. Die entsprechenden Analyseparameter sind der Tabelle Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 : Spezifikationen für die gaschromatographische Analyse von Buttersäure (Retentionszeit 5,4 min)

Hersteller & Typ	Agilent Technologies 7890B	
Säule	Agilent Technologies - HP5, 30 m x 0,32 mm	
Trägergas & Flow	Wasserstoff	1,5 ml·min ⁻¹
Make-up Gas & Flow	Helium	25 ml·min ⁻¹
Temp. Inlet & FID-Detektor	250 °C	300 °C
Split-Ratio und -Flow	1:25	75 ml·min ⁻¹
Injektionsvol. & -druck	1µl	0,5 bar
Temperaturrampe	35°C für 4 min, 10°C/min bis 120°C, 3 min bei 120°C	

5.2.2 Zelldichtebestimmung mittel Photometer

Die Bestimmung der Zelldichte wurde mittels Photometer Typ Libra S12 der Firma Biochrom Ltd. durchgeführt. Die Probe wurde dazu entsprechend verdünnt, sodass die Adsorption im linearen Bereich zwischen 0 und 0,9 bei 600 nm Wellenlänge lag. Im Falle der

Hochzelldichtefermentation wurde beim Animpfen Hochzelldichtemedium als Referenz genutzt. Im Laufe der Hochzelldichtefermentation und bei den Butanoxidationen musste im Verhältnis 1:10 bis 1:100 verdünnt werden, um im linearen Bereich zu messen. Hierbei wurde mit Reinstwasser ($>0,08 \mu\text{S}$) verdünnt und auch Reinstwasser als Referenz vermessen. Die 1:100 Verdünnung wurde dabei in zwei 1:10 Verdünnungsschritten durchgeführt. Weiter wurde darauf geachtet beim Verdünnen mindestens $50 \mu\text{l}$ Probenvolumen zu verwenden, um das Verhältnis von Pipettenspitzenwandfläche zu Volumen möglichst gering zu halten und so ein etwaiges Rückhalten der Zellen durch Interaktion von Zellen, Antischaummittel und Kunststoffwand zu minimieren. Zudem wurde stets die Pipettenspitze bei der Verdünnung mehrfach gespült. Nach jeder Verdünnung bzw. vor jeder photometrischen Messung wurde die Probe intensiv gemischt und zügig vermessen, um eine möglichst hohe Homogenität zu gewährleisten. In Vorversuchen wurde zudem eine Korrelation zwischen der optischen Dichte gemessen bei 600 nm Wellenlänge und der Biotrockenmasse bestimmt. Die Biotrockenmassebestimmung erfolgte durch Filtration eines definierten Probenvolumens mit vorher bestimmter optischer Dichte und anschließender Trocknung des Filterpapierses (Sartorius Stedim Biotech GmbH – Sartopore 2 mit $0,2 \mu\text{m}$ Porenweite) mit abgesetztem Filter/Zellkuchen. Durch die Bestimmung der gravimetrischen Differenz ließ sich damit ein Korrelationskoeffizient mit $0,495 \text{ g}_{\text{CDW}} \cdot \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1}$ bestimmen, welcher für die Betrachtungen in dieser Arbeit vereinfacht zu $0,5$ aufgerundet wurde (vgl. Anhang 37).

5.2.3 Bestimmung der gelösten Glukose mittels Blutzuckermessgerät

Die Quantifizierung der gelösten Glukose erfolgte mittels Blutzuckermessgerät „ACCU-CHEK“ der Firma Roche. Dabei werden Einweg-Messstreifen verwendet, welche im Bereich von $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ bis $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ die Glukosekonzentration bestimmen. Lag der gemessene Wert außerhalb des Messbereiches wurde dieses entsprechend vom Gerät angezeigt und es wurde eine Verdünnung durchgeführt und diese erneut vermessen und der Verdünnungsfaktor mit einberechnet. Unterhalb des Detektionslimit von $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respektive $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde dabei von Glukoselimitierung ausgegangen, was vom Gerät mit dem Hinweis „LOW“ angezeigt wurde.

5.3 Versuchsdurchführung

5.3.1 Zellgewinnung durch Hochzelldichtefermentation

Zur Gewinnung einer für mehrere Butanoxidationen in der Blasensäule ausreichenden Menge an Ganzzellbiokatalysator wurden Hochzelldichtefermentationen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen der Blasensäule ist mit 2 Liter nahezu identisch zum Volumen des Rührkessels von 2,5 L. Da in der Blasensäule Zelldichten von $OD_{600nm} = 10$ bis $OD_{600nm} = 15$ eingesetzt wurden, müssen die Zelldichten in der Hochzelldichtefermentation dementsprechend hoch sein, um mit den Zellen einer Hochzelldichtefermentation mehrere Butanoxidationen durchführen zu können.

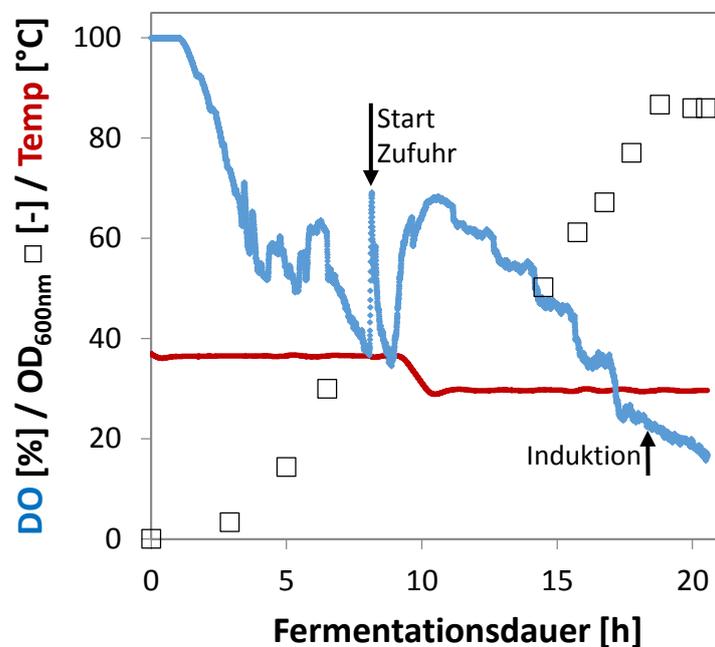


Abbildung 12 : Aufbau des Rührkesselfermenters für die Hochzelldichtefermentation; Medorex - 2,5 L Arbeitsvolumen; Start- $OD_{600nm} = 0,1$ mit 2 L HZD-Medium (siehe Anhang 31); Begasung mit $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; Nach 8,5 h Zufuhrstart mit Verdünnungsrate von $0,004 \text{ h}^{-1}$ mit HZD-Feed (siehe Anhang 32); Nach je 1,5 h zusätzlich $+0,001 \text{ h}^{-1}$ Verdünnungsrate; Nach 9 h von 37 °C auf 30 °C , $\text{pH} = 6,8$; Induktion 3 h vor Ende der Fermentation mit $0,025 \%$ Dicyclopropylketon.

Die aus der Hochzelldichte gewonnene Zellmasse reicht dabei mit durchschnittlich $OD_{600nm} = 60$ für 4 bis 6 Butanoxidationen. Besonders bei der Charakterisierung eines Prozessparameters wurden Zellen aus der gleichen Hochzelldichtefermentation verwendet, um einen Einfluss des biologischen Systems weiter ausschließen zu können. Zudem erfolgte die Einstellung der Zelldichte stets mit einer minimal angenommen spezifischen Aktivität der Zellen von $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Zudem wurde eine höhere Zelldichte und Aktivität um ca. 10 % eingesetzt, als, über den Butaneintrag abgeschätzt, nötig gewesen wäre.

Zu Beginn der Hochzelldichtefermentation wurde die pH-Sonde kalibriert und der Fermenter mit der Hochzelldichte-Salzlösung gefüllt. Alle nötigen Anbauten und Anschlüsse wurden befestigt und der Fermenter für 20 min bei 121°C über Nacht autoklaviert. Am nächsten Morgen erfolgte die Inokulierung eines 1 L Schüttelkolben mit demselben Medium wie später in der Hochzelldichtefementation. Während die Vorkultur bei 37°C für 8 h bei 120 UPM auf einem Orbitalschüttler (5 cm Auslenkung) fermentierte, wurde der sterile 2 L Fermenter weiter aufgebaut und an das Prozesskontrollsystem angeschlossen. Das komplette Versuchsprotokoll hierzu befindet sich im Anhang A02. Nach dem Überimpfen der Vorkultur in den Fermenter zu einer OD_{600nm} von 0,1 erfolgte eine Satzphase bei konstanten 37 °C. Nach 8 Stunden und komplettem Verbrauch der vorgelegten Glukose wurde der Glukosefeed mit einer initialen Verdünnungsrate von $D = 0,004 h^{-1}$ gestartet und nach 9 Stunden die Temperatur innerhalb einer Stunde auf 30 °C gesenkt und für den weiteren Verlauf konstant gehalten. Die Glukosezufuhr wurde während der Zufütterungsphase jede 90 min um weitere $0,001 h^{-1}$ erhöht. Die Induktion erfolgte mit 0,025 Vol.-% DCPK drei Stunden vor Ende der Fermentation bei einer Zelldichte von $OD_{600nm} \approx 65$. Nach dem Ende der Induktionszeit wurden die Zellen in 400 ml Zentrifugenbecher gefüllt und nach dem Austarieren bei 5000 UPM für 15 min abzentrifugiert. Die abgesetzte Zellfeuchtmasse wurde danach entsprechend in den Versuchen einzusetzenden Zelldichten in 50 ml Kunststoffröhrchen abgefüllt. Es erfolgte eine Lagerung bei -80 °C, wobei zwischen Einlagerung und Versuchsdurchführung die verwendeten Zellen in dieser Arbeit nicht mehr als 6 Monate Lagerdauer aufwiesen.

5.3.2 Aktivitätstests mit Butanol

Um die Zellaktivität bzgl. der Oxidation von Butan zur Buttersäure vor dem Einsatz in der Blasensäule zu quantifizieren wurden Aktivitätstests evaluiert. Dabei ist eine schnelle und praktikable Handhabung von gasförmigem Butan zur Aktivitätsbestimmung nicht praktikabel, weshalb sich für Aktivitätstest mit flüssigem Butanol entschieden wurde. Diese wurden im 1 L Schüttelkolben mit Schikanen bei 30 °C und 120 UPM (5 cm Auslenkung) auf einem Orbitalschüttler durchgeführt. Die Zellen wurden zu einer Zelldichte von $OD_{600nm} = 4$ in Minimal-Medium (M9) resuspendiert und auf 30 °C vorgewärmt. Nach der Zugabe von 50 mM Butanol wurde der zeitliche Umsatz zur Buttersäure über Beprobung und anschließender Analyse mittels GC bestimmt.

5.3.3 Butanoxidation in der Blasensäule

Vor Beginn der eigentlichen fermentativen Oxidation in der Blasensäule wurde am Tage zuvor der Versuchsaufbau in Betrieb genommen. Dazu wurde die pH-Elektrode mit Maßlösungen bei $\text{pH} = 7$ und $\text{pH} = 4$ kalibriert und anschließend bis zum Versuchsbeginn in 3 M Kaliumchlorid-Lösung aufbewahrt. Außerdem wurde die Sauerstoffsonde zur Polarisierung an die Versorgungsspannung des Messverstärkers angeschlossen. Weiter wurden neue Septen in die entsprechenden Schraubhalter eingesetzt und sterile Spritzen mit Glukose und Antischaummittel gefüllt, mit sterilen Zufuhrschläuchen ausgestattet und in die Spritzenpumpen eingespannt. Um eine Desinfektion der Blasensäule zu ermöglichen wurden 4 L einer 2 % Korsolex-Desinfektionslösung (Bode Chemie GmbH – Hamburg) angesetzt und diese durch den Probenahmeschlauch von unten in die Blasensäule gefüllt. Eine weitere Spritze wurde mit derselben Desinfektionslösung gefüllt und damit der eigentlichen Begasungsadapter soweit gespült bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Die Befüllung mit Korsolex-Lösung erfolgte soweit, dass sämtliche Luft nach oben aus dem Abgasschlauch der Blasensäule herausgedrückt und zurück in das Vorlagegefäß geleitet wurde. Die Desinfektionslösung wurde zur vollständigen Desinfektion über Nacht (mindestens 12 Stunden) in der Blasensäule belassen, wobei für eine 99,9 %-ige Inaktivierung aller möglichen Keime bei dieser Verdünnung eine Einwirkzeit von 2 Stunden laut Herstellerangaben ausreicht. Die Desinfektion wurde trotz der folgenden semi-sterilen Operation der Blasensäule wie beschrieben durchgeführt, da die Desinfektion über Nacht keinen Mehraufwand bedeutete und so am Versuchstag mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einem nahezu sterilen Reaktor der Versuch durchgeführt werden konnte. Dazu wurde zunächst die Desinfektionslösung komplett in das Vorlagegefäß zurückgeleitet. Anschließend wurde der Probenahmeschlauch an eine Wasserstrahlpumpe zur Absaugung angeschlossen und über den Deckelflansch der Blasensäule mittels Sprüheinrichtung die Blasensäule mit kaltem Frischwasser gereinigt. Die Reinigung erfolgte so lange bis keine Reste der Desinfektionslösung, erkennbar am Schaum, bzw. an der Bläschenbildung mehr vorhanden waren. Der Begasungsadapter wurde mit Reinstwasser über eine Spritze so lange gespült bis auch hier keine Reste an Desinfektionslösung mehr austraten. Danach wurde der Probenahmeschlauch von der Wasserstrahlpumpe getrennt und mittels Schlauchklemme die Blasensäule nach unten hin verschlossen. Es folgte das Einfüllen des M9 minimalen Mediums (2 L) über den Deckelflasch und die Begasung mit $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ Luft wurde gestartet, um ein

Einfließen des Mediums in den Begasungsadapter zu verhindern. Die Temperierung auf 30 °C erfolgte über einen Doppelmantel mit angeschlossenem Umwälzthermostat. Während der Aufheizphase wurden die entsprechenden Zufuhrschläuche für Ammoniakwasser (NH₄OH), Glukose und Antischaummittel mit Kanülen (0,4 mm Durchmesser) versehen und in durch die vorgesehenen Septen am Deckelflansch in die Blasensäule geführt. Die Schläuche wurden danach bis zur Kanülenspitze mit der entsprechenden Lösung vorgefüllt, wobei zu Beginn 5 Tropfen Antischaummittel zugegeben wurden, um bei der späteren Zugabe der Zellen die Schaumbildung zu minimieren. Nach dem Erreichen der Solltemperatur von 30 °C wurde die Sauerstoffelektrode auf 100 % kalibriert und danach auf eine Begasung mit reinem Stickstoff umgestellt, um auch hier nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes den Wert für 0 % an gelöstem Sauerstoff zu kalibrieren. Es erfolgte danach eine weitere Kalibrierung bei 100% nach dem Wechsel zurück zur Begasung mit Luft. Weiter wurde die pH-Regelung gestartet, um den pH-Wert in allen Experimenten möglichst konstant bei pH = 6,8 zu halten. Da der Erhaltungsstoffwechsel und die Oxidation des Butans entsprechend saure Produkte hervorbringen, war eine einseitige pH-Regelung mittels Base (25 % NH₄OH entspricht 13,3 mol·L⁻¹) ausreichend. Wenn alle Prozessparameter entsprechend korrekt vorlagen, wurden die 50 ml Kunststoffgefäße mit den Zellen aus der -80 °C Lagerung genommen und in einem Becherglas mit 50 °C warmen Wasser solange aufbewahrt, bis ein dünner Flüssigkeitsfilm am Inneren des Kunststoffgefäßes zu erkennen war. Dieses Auftauen dauerte ca. 1 - 2 Minuten und es wurde zwischendurch durch Herausnehmen und kräftiges Beschleunigen des Kunststoffgefäßes überprüft, ob sich der gefrorene Zellblock im Inneren des Gefäßes verschieben konnte. Sobald diese Verschiebbarkeit festgestellt wurde, konnte der Zellblock in eine 50 ml Einwegspritze überführt werden, indem zuvor der Druckkolben entfernt wurde. Die Spritze wurde mit dem Druckkolben entsprechend verschlossen und diese möglichst zügig an den Luer-Lock Verbinder des Probenahmeschlauches der Blasensäule angeschlossen. Die entsprechende Schlauchklemme wurde geöffnet und es erfolgte die Resuspension der Zellen durch stetiges Aufziehen und Herauspumpen des Mediums bis der Zellblock komplett aufgelöst wurde und die Zellen resuspendiert in der Blasensäule vorlagen. Nun wurde die optische Dichte gemessen und zweimal durch erneute Beprobung bestätigt. Mit der spezifischen Glukosezufuhr rate wurde dann die Glukosezufuhr rate berechnet und an der Spritzenpumpe eingestellt und gestartet. Der Abgasschlauch der Blasensäule wurde mit der Waschflasche verbunden. Nach einer Adaptionszeit von 10 min erfolgte die Inertisierung

der Blasensäule mit Stickstoff (1 bar Vordruck) über die MFCs. Bei Erreichen eines Levels von 10 % des Gelöstsauerstoffes bei 30°C wurde die Stickstoffzufuhr vor dem MFC geschlossen und die Begasung mit dem Butan-Luft Gemisch (1 bar Vordruck) mit vorher eingestellter Begasungsrate gestartet. Gleichzeitig wurde die Reaktionszeit auf null gesetzt und die Aufzeichnung der Prozessdaten gestartet.

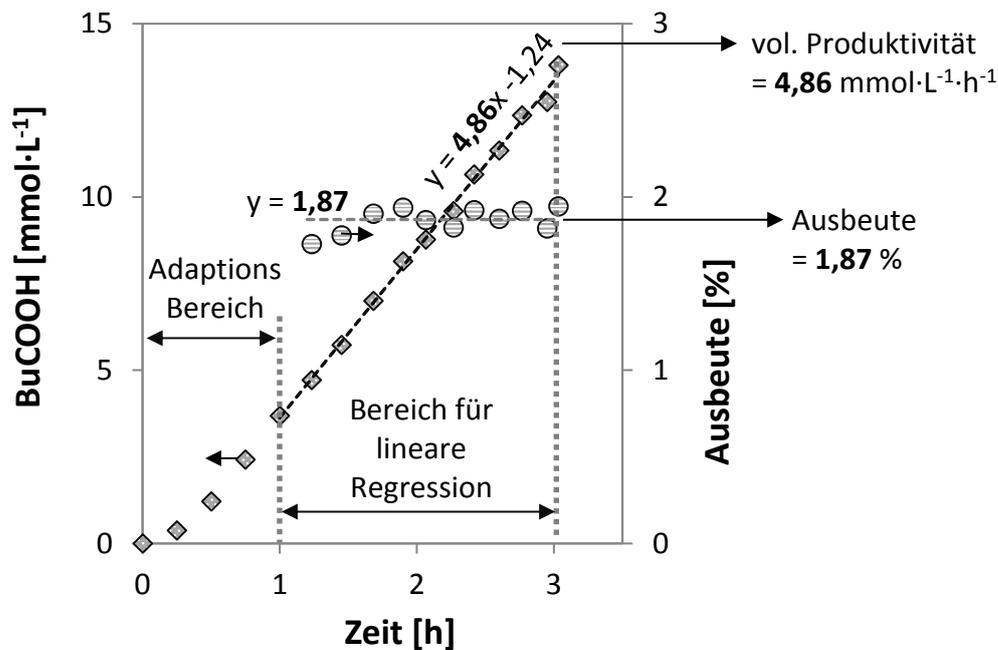


Abbildung 13 : Schema zum zeitl. Verlauf der BuCOOH-Konzentration bei der Oxidation von Butan; volumetrische Produktivität [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] über lin. Regression ab ca. 1 Stunde; Ausbeute [%] bestimmt über die im selben Zeitintervall eingetragene Butanmenge (hier $0,954 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 20 % v/v) von $1,28 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; 2 L Medium bei 30°C.

Die Beprobung erfolgte über den Probenahmeschlauch am Bodenflansch des Reaktors, wobei hierzu eine 10 ml Spritze 10-mal aufgezogen und zurückgedrückt wurde, um den Probenahmeschlauch (3 ml Totvolumen) ausreichend zu spülen und eine möglichst gleiche Produktkonzentration in Reaktor und Probe zu gewährleisten. Die Probenbehandlung und Analytik erfolgte wie unter 5.2.1 beschrieben und die zeitliche Änderung der Buttersäurekonzentration wurde, wie im Folgenden beschrieben, ausgewertet. Abbildung 13 zeigt den typischen zeitlichen Verlauf der Buttersäurekonzentration. Die volumetrische Produktivität ergibt sich aus der linearen Regression in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Weiter kann damit die Ausbeute im selben Bereich aus der eingetragenen Butanmenge auf Basis des Begasungsstromes mit Butangehalt und Druck berechnet werden. Diese lässt sich mit der volumetrischen Produktivität jeweils zwischen zwei Beprobungszeitpunkten berechnen und danach über den linearen Bereich mitteln wie in Abbildung 13 gezeigt. Die Berechnung der

Ausbeute lässt sich weiter direkt über die volumetrische Produktivität des gesamten Versuches mit dem zeitlichen Butanstrom berechnen, da der Gasstrom durch die MFCs ausreichend konstant gehalten wird. Die Schwankungen liegen im verwendeten Versuchssetup bei unter $0,01 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, was einem relativen Fehler von $0,7\% - 4\%$ je nach Begasungsrate entspricht. So wurde im Versuch in Abbildung 13 mit einem Gasstrom von $0,954 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei Normaldruck begast. Daraus ergeben sich $57,24 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ was mit $22,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $20\% \text{ v/v}$ Butangehalt einem Butanstrom von $0,511 \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}$ entspricht. Bei 2 Liter Medium werden damit $0,255 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ Butan durch den Reaktor geleitet. Der Quotient aus der volumetrischen Produktivität ($4,86 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) und dem zugeführten Butanstrom ($255 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) in Prozent ausgedrückt entspricht dabei der Ausbeute von $1,87\%$.

5.3.4 Variationen in der Betriebsweise der Blasensäule

Zur Charakterisierung der Butanoxidation in der Blasensäule wurden die Prozessparameter, Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butangehalt variiert. Zudem wurden die beiden Blasensäulenglaszylinder übereinandergesetzt, um so mit einem Reaktionsvolumen von 5 L mit 95 cm Füllhöhe Versuche durchführen zu können. Die Änderung der Reaktionstemperatur wurde über die Sollwerttemperatur am Umwälzthermostaten vorgenommen, wobei hier auch die Temperaturfolgeregelung anhand einer vorher programmierten Rampe erfolgen konnte. Die Begasungsrate konnte über die MFCs geregelt werden, wobei die Berechnung von Soll- und Istwert den Systemdruck sowie den Butangehalt beinhaltet. Eine Änderung erfolgte durch Einstellung eines neuen Sollwertes wobei der Regler innerhalb weniger Sekunden den Istwert entsprechend angepasst. Der Überdruck/ Systemdruck in der Blasensäule wurde durch ein vor der Waschflasche angebrachtes Nadelventil bzw. eine Kapillare mit definiertem Druckverlust realisiert, wobei nur bei der Verwendung des Nadelventils eine Druckänderung während der Reaktion möglich ist. Der Butangehalt muss bei der Verwendung von vorgemischten Gasen dementsprechend vorher festgelegt werden und kann somit nur bei einem Gasflaschenwechsel geändert werden. Hier soll in Zukunft eine Gasmischstation realisiert werden (siehe Ausblick). Bei der Vergrößerung der Füllhöhe wurden beide Glaszylinder der Blasensäule mittels Flanschverbindung übereinandergestellt und gegeneinander mit einer Flachdichtung abgedichtet. Das H/D Verhältnis erhöht sich dabei auf ca. $11,8$ (Normalbetrieb mit 2 L weist $H/D = 5,3$).

6 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse dieser Arbeit eingegangen und diese werden diskutiert. Dabei wird zuerst der Reaktoraufbau (6.1) erläutert, welcher Grundvoraussetzung für die fermentative Butanoxidation ist. Anschließend werden die Ergebnisse der Charakterisierung durch Variation der relevanten Prozessparameter Begasungsrate (6.3.1), Druck (6.3.4), Temperatur (6.3.3) und Butananteil (6.3.2) dargestellt und diskutiert. Es folgen die Ergebnisse zur minimalen Sauerstoffkonzentration (6.3.6) und minimalen spezifischen Glukosezufuhr rate (6.2.1). Auf Basis der Charakterisierung wird eine Berechnungsvorschrift für die volumetrische Produktivität (6.4) in Abhängigkeit der Prozessparameter aufgestellt und mit dem Optimum erfolgt eine Validierung. Anschließend wird in der übergreifenden Diskussion (6.6) auf die gegenseitige Beeinflussung der Prozessparameter eingegangen und die Übertragbarkeit über den k_{La} -Wert zu anderen Reaktorsystemen gezeigt und diskutiert (6.6.1). Es folgt eine Priorisierung der Prozessparameter zur Steigerung von volumetrischer Produktivität und Ausbeute (6.6.2) sowie eine Skalierungsabschätzung (6.6.3). Auf Basis aller Ergebnisse wird zusammenfassend das Prozessfenster im Hinblick auf eine industriell relevante Produktivität und Ausbeute diskutiert und der Prozess dementsprechend bewertet (6.6.4).

6.1 Erstellung des Reaktoraufbaus

Für die fermentative Oxidation von Butan im Labormaßstab, musste ein geeigneter Reaktoraufbau mit Sicherheitseinrichtungen und entsprechendem Kontrollsystem ausgelegt, konstruiert und in Betrieb genommen werden (siehe Abbildung 14). In einem ersten Schritt wurde die Gasversorgung in den Laborabzug durch ein Fachbetrieb installiert und mit Gassensoren für Butan und Sicherheitsventilen an ein laborübergreifendes Alarmsystem angeschlossen (siehe 5.1.3). Für die Oxidationsversuche wurde ein bestehender Glashohlzylinder mit Doppelmantel weiter modifiziert und als Grundkörper für den Blasensäulenreaktor verwendet. Dazu wurden Deckel- und Bodenflansche aus 1.4301-Stahl konstruiert, welche es ermöglichen Equipment wie Messsonden, Abgaskondensatoren, Septen, Probenahme-Einrichtungen etc. dicht mit dem Reaktor zu verbinden (siehe Abbildung 9). Zudem wurde der Reaktoraufbau im Abzug ausgelegt und konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, einen übersichtlichen Aufbau zu erstellen, bei dem alle Bedienelemente übersichtlich angeordnet und direkt erreichbar sind. Alle Kabel, Schläuche und Rohre wurden eindeutig beschriftet, fixiert und geordnet und über Aluminiumprofile koordiniert. Daneben

wurde ein Mess-, Steuer- und Regelungssystem ausgelegt und konstruiert. Dieses wurde über ein Input/Output Modul realisiert (vgl. 5.1.2) wobei ein Hochzelldichte-Fermenter und zwei Blasensäulen parallel betrieben werden können.



Abbildung 14 : Reaktoraufbau im Laborabzug; Rührkesselfermenter zur Hochzelldichtefermentation; Zwei 2 L Blasensäulen zur fermentativen Oxidation von Butan; Peripherie zur Kontrolle inkl. Sicherheitseinrichtungen; Kabel, Rohre und Schläuche rückseitig auf den Aluminiumprofilen geführt

Die zugehörige Bedienoberfläche wurde so programmiert, dass alle prozessrelevanten Parameter übersichtlich dargestellt werden. Eine Bedienung kann dabei über einen mittels Schwenkarmes beweglichen Bildschirm mit Berührungsfunktion (vgl. 5.1.2) direkt am Laborabzug durchgeführt werden. Als ein Sicherheitskriterium musste eine Parameteränderung mit einer zweifachen Bestätigung durchgeführt werden, um unbeabsichtigte Fehlbedienungen ausschließen zu können. Die drei Reaktorpositionen im Laborabzug sind mit folgenden Anschlüssen ausgerüstet, welche für eine Standard-Fermentation benötigt werden. Dazu gehören eine Messung der Gelöst-Sauerstoffkonzentration, eine pH-Messung und Regelung, diverse Möglichkeiten der Zufuhr von Flüssigkeiten wie Glukoselösung, Antischaummittel und Titrierlauge, die Messung und Regelung der Temperatur und die Messung und Regelung der Begasung über Mass-Flow-Controller wobei alle Mess- und Regelsysteme für die Reaktoren unabhängig voneinander sind. So wurde das Gesamtkonzept so ausgelegt, dass es auch möglich ist andere Reaktoren oder Reaktortypen an den jeweiligen Positionen zu betreiben. Auch der Anschluss von weiterem Aufbereitungsequipment wie Waschflaschen, Kondensatoren für eine Rezyklierung oder nachgeschalteten Extraktionskolonnen lässt sich realisieren. Somit wurde unter

Beachtung und Planung auf die Projektweiterführung der Reaktoraufbau und das Kontrollsystem weiter optimiert (Siehe Kapitel 8).

6.2 Butanoxifikationen in der Blasensäule

Bei der fermentativen Oxidation in der Blasensäule wurde die Buttersäurekonzentration im Medium in Abhängigkeit der Versuchsdauer mittels Gaschromatographie bestimmt und entsprechend aufgetragen. Das verwendete alkBGT Enzymsystem oxidiert dabei das eingetragene Butan über Butanol und Butyraldehyd zur Buttersäure. Dabei ist es in keinem der Versuche zu einer Akkumulation des Zwischenproduktes Butyraldehyd gekommen, bzw. lag diese unter der Detektionsgrenze von ca. $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Auch eine Akkumulation des Zwischenproduktes Butanol lag nur in geringem Maße ($< 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) vor und ist damit im Vergleich zur Buttersäurekonzentration (bis zu $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) vernachlässigbar. Der zeitliche Anstieg der Buttersäurekonzentration kann somit als volumetrische Produktivität definiert werden. Dabei ergibt sich der hierfür typische Verlauf der ansteigenden Buttersäurekonzentration mit der Versuchszeit in Abbildung 15.

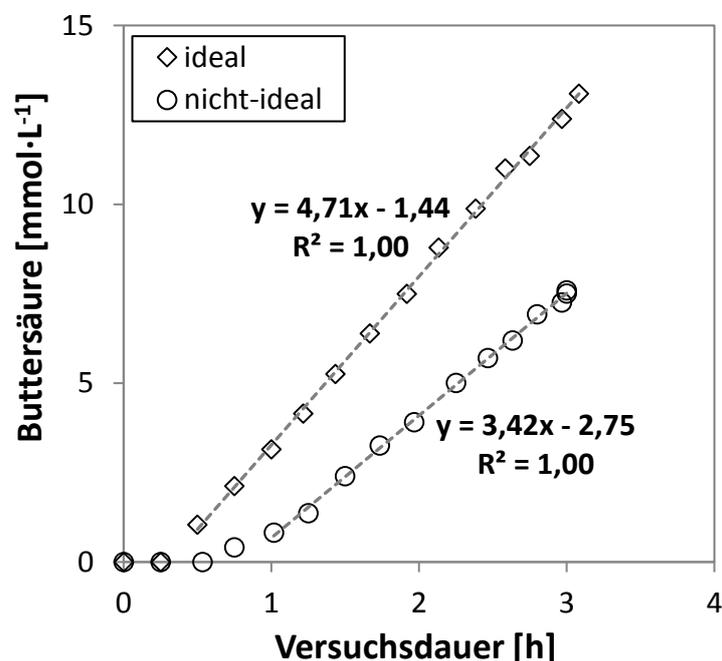


Abbildung 15 : Beispiel einer Butanoxidation in der Blasensäule mit zeitlichem Verlauf der Buttersäurekonzentration; idealer Versuch (Rauten) und nicht-idealer Versuch (Kreise) bei gleichen Prozessbedingungen von $0,954 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 20 % v/v Butan bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

In diesem Beispiel wurden bei zwei Versuchen die relevanten Prozessparameter Begasungsrate mit $0,954 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 20 % v/v bei 30°C und gewählt. In einem Versuch waren die Zellen aus der Hochzellichtefermentation nicht optimal induziert und es war Restglukose

vorhanden, weshalb die Oxidation erst verspätet und danach limitiert einsetzt. Die Berechnung der volumetrischen Produktivität und der Ausbeute wird dabei analog wie im Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Aus der Regressionssteigung im linearen Bereich lässt sich die volumetrische Produktivität bestimmen.

Tabelle 4 : Übersicht der Butanoxidation in der Blasensäule mit den relevanten Prozessparametern und der sich ergebenden volumetrischen Produktivität und Ausbeute.

Versuchs#	Prozessparameter					Zielgrößen	
	Begasungsrate (auf 1 atm)	Temp.	Überdruck	Butangehalt	OD _{600nm}	Vol. Prod.	Ausbeute
	[L·min ⁻¹]	[°C]	[mbar]	[% v/v]	[-]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹] ¹	[%]
#09	1,5	30	100	14	15,3	6,2	2,4
#10	1,5	30	100	14	15,3	6,4	2,3
#11	1	30	100	14	14,0	4,5	2,4
#12	0,76	30	100	17	15,2	3,9	2,2
#13	0,5	30	100	14	16,6	2,9	3,1
#15	0,76	30	100	14	13,5	3,7	2,6
#16	0,76	30	100	20	12,5	4,0	2,0
#17	0,954	30	505	14	13,8	5,8	3,2
#18	0,828	30	303	14	12,0	4,6	3,0
#19	0,76	25	100	17	11,7	1,7	1,0
#21	0,76	34,5	100	17	12,0	4,8	2,8
#22	0,76	39,5	100	17	12,0	5,9	3,4
#23	0,25	30	100	14	6,7	2,2	4,6
#25	0,25	30	100	20	5,1	*1 2,3	3,4
#26	0,954	30	500	20	10,0	4,7	1,8
#28	0,954	30	500	20	12,5	4,9	2,1
#30	0,954	30	500	20	14,0	4,7	1,8
#31	0,76	30	100	28	10,0	3,0	1,0
#32	0,76	30	100	23	11,0	3,8	1,6
#34	1,82	35	500	14	23,0	*2 9,4	2,7
#35	0,76	30	100	14	9,0	*3 2,8	5,0

*1 : 1. Versuch mit 5 Liter

*2 : Versuch mit Optimum im Prozessfenster

*3 : 2. Versuch mit 5 Liter

In diesem Beispiel liegt diese für die ideale Oxidation bei 4,71 mmol·L⁻¹·h⁻¹ und bei der nicht-idealen Oxidation bei 3,42 mmol·L⁻¹·h⁻¹. Die dem Reaktor zugeführte Begasungsmenge des Butans lässt sich über die Versuchsbedingungen zu 255,5 mmol·L⁻¹·h⁻¹ berechnen. Die

Ausbeute lässt sich damit als Quotient aus volumetrischer Produktivität und eingetragendem Butanstrom für die ideale Oxidation zu 1,84 % und für die nicht-ideale zu 1,33 % bestimmen. Alle für diese Auswertung relevanten Versuche sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Der hier ideale Versuch ist unter #30 zu finden. Die Begasungsrate ist hier druckkorrigiert (auf 1 bar abs.) angegeben, um direkt auf den zugeführten Mengenstrom von Butan in den Reaktor und damit auf die Ausbeute schließen zu können. Sind während des Versuches direkt Limitierungen aufgefallen, wurden diese Ergebnisse nicht in die Charakterisierung mit einbezogen. Lagen die Ergebnisse außerhalb des sich aus der Charakterisierung ergebenden Trends, wurden diese wiederholt, um die Ergebnisse zu bestätigen oder zu widerlegen. Dieses Vorgehen wird bei #26, #28 und #29 sichtbar, wo drei Versuche mit denselben Prozessbedingungen durchgeführt wurden, wobei die eingesetzte Zelldichte variiert wurde, um eine Limitation durch das biologische System ausschließen zu können (vgl. 6.2.1)

Die nachfolgenden Ergebnisse der Charakterisierung greifen dabei auf die Versuche aus Tabelle 4 zurück. Eine detaillierte Übersicht aller Versuchsbedingungen findet sich unter Anhang 4. Hier sind auch die sich ergebenden maximalen Löslichkeiten von Sauerstoff und Butan, sowie die aus den Experimenten resultierenden spezifischen Aktivitäten und Glukosezufuhrdaten tabellarisch aufgeführt.

6.2.1 Einfluss des biologischen Systems

Für die Charakterisierung des physikalischen Butantransfers sollte die Butanaufnahmerate größer sein als die Butantransfertrate ins Medium, um eine Limitierung durch das biologische System/ die eingesetzte Zellaktivität ausschließen zu können. Deshalb sollte im Idealfall vor der Reaktion über die gewählten Prozessparameter der Butantransfer ins Medium approximiert werden und dann mit der spezifischen Zellaktivität eine ausreichende Zelldichte gewählt werden. Diese sollte so gering wie möglich sein, um die Vorkulturmenge zu minimieren und den Glukose- und Gesamtsauerstoffverbrauch gering zu halten. Jedoch so hoch wie nötig, damit möglichst jedes eingetragene Butanmolekül auch umgesetzt wird. Diese Annahme setzt voraus, dass der limitierende Schritt des Stofftransportes nicht bei dem Transport über die Zellmembran bzw. bei dem anschließenden Umsatz durch das Enzymsystem auftritt. Wäre dieses der Fall, würde eine höhere Zelldichte automatisch auch eine größere Oberfläche an Zellmembran bzw. eine Erhöhung der Menge an aktives Enzym bedeuten und damit die volumetrische Produktivität und die Ausbeute steigen. Bei den

Versuchen zur Charakterisierung des Prozesses wurde deshalb versucht höhere Zelldichten einzusetzen, als es entsprechend dem vorher abgeschätzten Butaneintrag notwendig ist. Dazu wurden in den ersten Testversuchen die spezifischen Aktivitäten bestimmt und mit diesen Werten die Zelldichte für die weiteren Versuche abgeschätzt. Dabei zeigten sich oft höhere spezifische Zellaktivitäten von $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bis zu $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, weshalb die hier im Laufe der Versuche die für die Berechnung der Zelldichte verwendete Minimalaktivität angepasst wurde. Die Versuche mit 20 % v/v und 500 mbar wurde dreifach mit jeweils unterschiedlichen Zelldichten ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 10, 12,5$ und 14) durchgeführt, um einen Einfluss durch das biologische System respektive die Butanaufnahmerate der Zellen und der Gelöstkonzentration von Butan im Medium ausschließen zu können. Dabei lag die volumetrische Produktivität reproduzierbar im Mittel bei $4,75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von 0,74 % wie in Abbildung 16 (1. Teilgraph von links - Rauten) gezeigt.

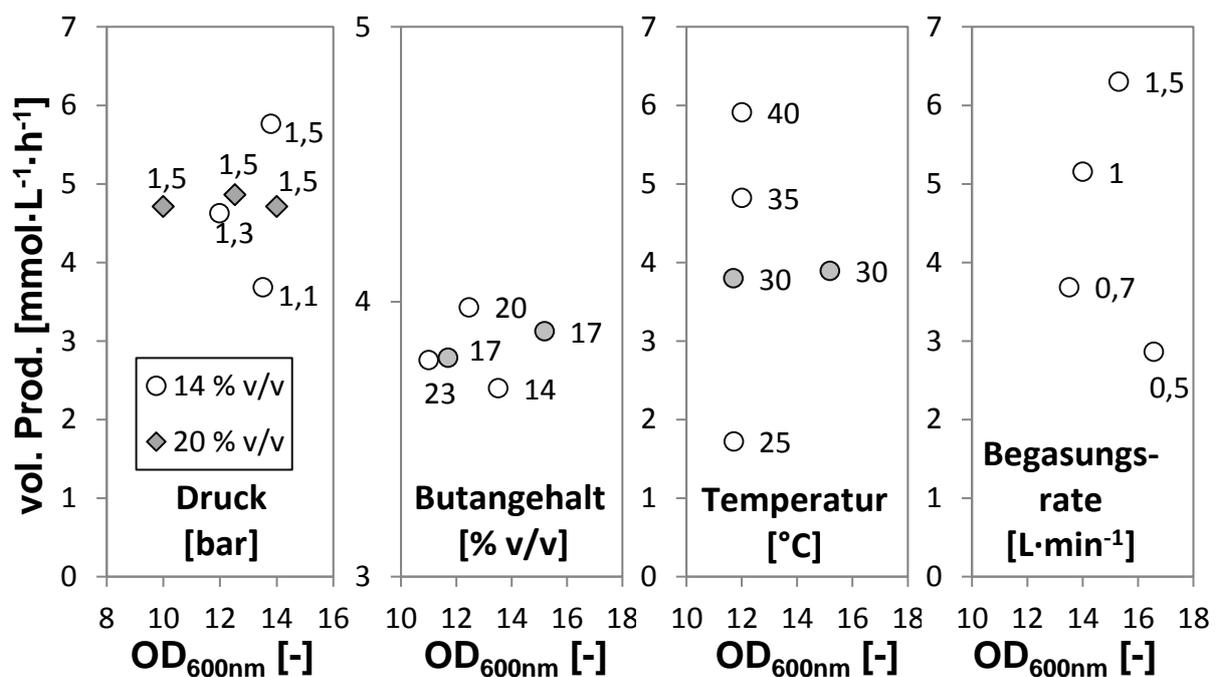


Abbildung 16 : Einfluss der Zelldichte auf die volumetrische Produktivität [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]; Daten aus der Charakterisierung für die relevanten Prozessparameter Druck [bar], Butangehalt [% v/v] Temperatur [°C] und die Begasungsrate [$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$]; Die Werte der einzelnen Prozessparameter sind direkt als Datenreihenbeschriftung in jeder Teilabbildung vorhanden.

Auch für die anderen Versuchsreihen in Abbildung 16 der Charakterisierung durch Variation der Prozessparameter ist kein Einfluss der Zelldichte auf die volumetrische Produktivität zu erkennen. Die entsprechende Variation der Prozessparameter ist dabei direkt an den Punkten im Graph mit Werten gekennzeichnet. Besonders bei den Versuchen mit Doppelbestimmung (grau gefüllte Markierungen) fällt auf, dass die Erhöhung der Zelldichte in keiner Erhöhung der

volumetrischen Produktivität resultiert. Eine Limitierung der vol. Produktivität durch die Zellen kann somit ausgeschlossen werden.

Weiter wurde die Aliquotierung der Zellmasse nach der Hochzelldichtefermentation der Anzahl der Zentrifugenbecher angepasst. Die Ernte der Zellmasse sollte so zügig wie möglich erfolgen, um den Aktivitätsverlust so gering wie möglich zu halten. Die abzentrifugierte Zellmasse wurde aus je einem Zentrifugenbecher in ein bzw. zwei 50 ml Kunststoffproberöhrchen gefüllt. Zum Versuchsstart wurden die Probenröhrchen aus der Lagerung bei -80°C herausgenommen und in warmem Wasser aufgetaut. Sobald eine dünne Schicht des Zellblocks an den Wänden des Kunststoffgefäßes aufgetaut war, wurde der komplette Zellblock im Reaktor resuspendiert. Hier wurde ein zügiges Resuspendieren einer genauen Einwaage der Zellmasse vorgezogen. So wurde die für den Versuch benötigte Zelldichte abgeschätzt, die Einstellung der Zelldichte im Reaktor war jedoch nicht stetig möglich, sondern diskret durch die gefrorene Zellblockmasse vorgegeben. Zudem variierten die Zellblockmassen je nach Zelldichte bei der Ernte aus der Hochzelldichtefermentation. Da die Zellaktivität und damit die Butanaufnahmerate stets größer als der Butaneintrag eingestellt werden sollte, war eine gering abweichende Zelldichte als die zuvor approximierte zu vernachlässigen.

6.2.1 Spezifische Glukosezufuhrtrate

Um den Prozess und den Butaneintrag zu charakterisieren muss der Einfluss des biologischen Systems entweder eindeutig quantifiziert sein, oder so gewählt, dass dieser möglichst nicht limitierend ist. Erst dann ist eine Limitierung beim Butaneintrag eindeutig der Kombination der Prozessparameter zuzuschreiben. Neben der eingesetzten Zelldichte sollte die Glukosezufuhrtrate so gewählt werden, dass die daraus resultierende Gesamtaktivität größer ist als der Butaneintrag ins Medium. In den ersten Experimenten wurden dabei im Vergleich hohe spezifische Glukosezufuhrraten eingestellt, um eine Glukoselimitierung eindeutig ausschließen zu können. Im Laufe der Versuchsreihen wurde die spezifische Glukosezufuhrtrate dabei sukzessive verringert und darauf geachtet inwieweit diese Reduktion Einfluss auf die volumetrische Produktivität hat. So wurde die spezifische Glukosezufuhrtrate von anfangs $750 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf $80 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ verringert. Dabei liegt dieser Wert so gering, dass im Versuch kein messbares Wachstum, auch über 18 Stunden Versuchsdauer, zu verzeichnen war. Mit dieser spezifischen Glukosezufuhrtrate konnten wie in Abbildung 17

gezeigt die höchsten volumetrischen Produktivitäten von $9,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreicht werden. Der Wert $80 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ stellt dabei nicht das Minimum der Glukosezufuhr dar, welches für die sich ergebene volumetrische Produktivität nötig ist.

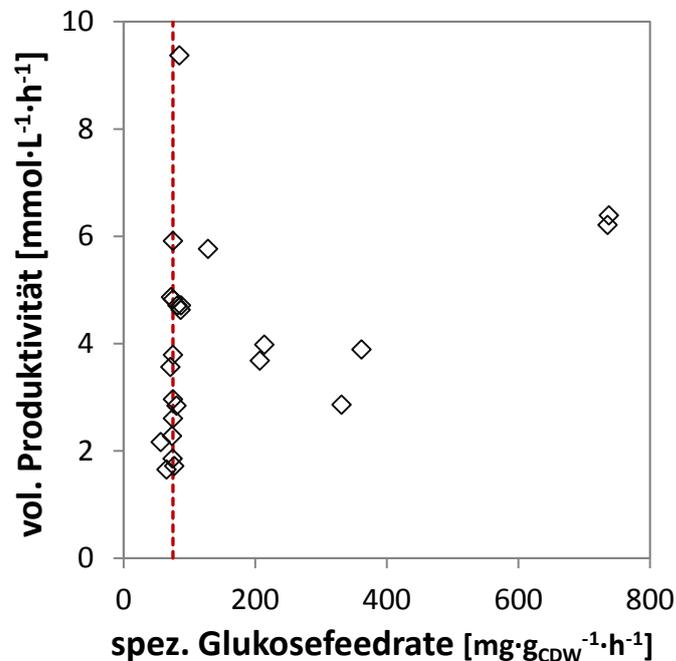


Abbildung 17 : Einfluss der spezifischen Glukosezufuhr auf die volumetrische Produktivität - Daten von allen Experimenten entsprechende Variation aller Prozessparameter im Prozessfenster

Er zeigt stattdessen, dass der gewählte Wert ausreicht, um Systeme mit dieser volumetrischen Produktivität nicht zu limitieren und so eine Charakterisierung des Systems zu ermöglichen. Sollte die Produktivität weiter gesteigert werden, besteht also die Möglichkeit, dass die spezifische Glukosezufuhr von $80 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nicht mehr ausreicht und entsprechend an den Butaneintrag angepasst werden muss. Weiter zeigt Abbildung 18 die Ausbeute an produzierter Buttersäure bezogen auf die zugeführte Glukosestoffmenge.

Hierbei wird deutlich, dass die verwendeten spezifischen Glukosezufuhrraten ausreichen, um bei einigen Versuchen mehr als zwei Moleküle Buttersäure pro Molekül Glukose zu erreichen. Liegt Glukose in höherer Konzentration vor oder wird mit einer hohen spezifischen Rate zugeführt, kommt es dabei zum messbaren Zellwachstum. In den ersten Experimenten dieser Arbeit mit hohen spezifischen Glukosezufuhrraten, kam es deshalb teilweise zu einer Erhöhung der Zelldichte um $\text{OD}_{600\text{nm}} = 5$, was mit der entsprechenden Reaktionszeit einer linear vereinfachten Wachstumsrate von über $0,6 \text{ OD}_{600\text{nm}}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. $0,3 \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ entspricht. Ab einer spezifischen Glukosezufuhr von $80 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ war kein Zellwachstum mehr

festzustellen. Zusammengefasst erlaubt die hier herausgestellte minimale spezifische Glukosezufuhr rate hohe volumetrische Produktivitäten bis mindestens $9,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und Ausbeuten von über zwei Mol Buttersäure pro Mol Glukose ohne das ein quantifizierbares Zellwachstum stattfindet.

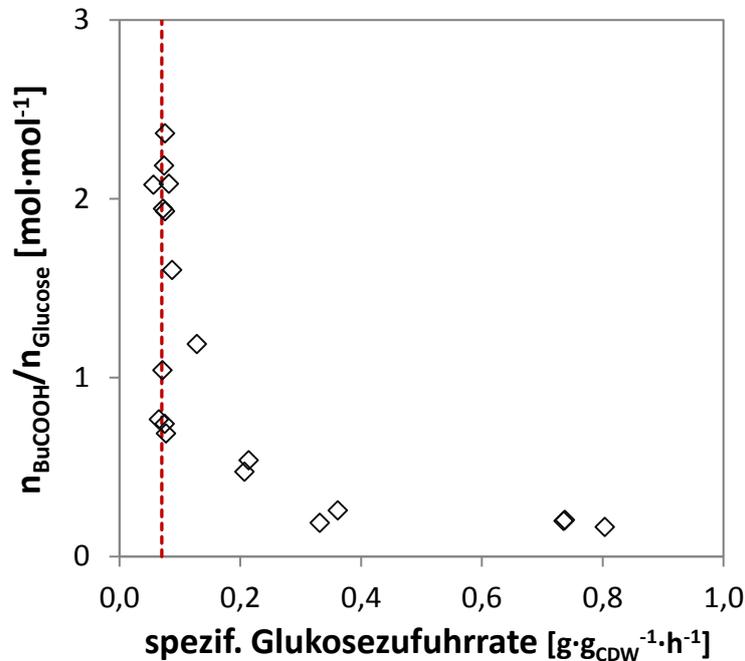


Abbildung 18 : Einfluss der spezifischen Glukosezufuhr rate auf die Ausbeute von Buttersäure pro zugeführter Glukoseeinheit

Entsprechend wird die Glukose hier effizient zugeführt, um eine Charakterisierung mit höherer Butanaufnahme als dem Butaneintrag zu ermöglichen. Für eine optimale Produktion wäre es dabei wichtig, den Einfluss der spezifischen Glukosezufuhr rate weiter zu quantifizieren. So wäre eine klare Differenzierung des Glukosebedarfs für die Oxidation und den Erhaltungstoffwechsel von Vorteil, um die Glukose möglichst ökonomisch zuzuführen.

6.3 Relevante Prozessparameter

Beim Betrieb des Blasensäulenreaktors zur fermentativen Oxidation von Butan wurden die im Folgenden aufgeführten Prozessparameter als relevant klassifiziert werden. Diese können dabei während des Prozesses verändert werden oder müssen vor den jeweiligen Experimenten festgelegt werden. Der Einfluss der entsprechenden Parameter auf die Buttersäurekonzentration als zentrale intensive Zustandsgröße wurde durch Variation dieser bestimmt. Hierzu wurde die volumetrische Produktivität als Regressionssteigung des zeitlichen Verlaufs der Buttersäurekonzentration herangezogen. Der sich dabei ergebene Trend der volumetrischen Produktivität in Abhängigkeit der einzelnen Prozessparameter ist in

den Graphen des Folgekapitels durch Regression aufgezeigt und über die angegebene Gleichung quantifizierbar. Dabei sind die Regressionsgleichungen so gewählt, dass der Trend möglichst genau abgebildet wird und eine simple Einbindung in die Gesamtcharakterisierung erlaubt. (6.4) Eine Extrapolation der Regressionsgleichungen ist dabei nur eingeschränkt möglich. Weiter wurde die Ausbeute über die Buttersäurekonzentration in einem definierten Zeitintervall bestimmt. Diese wurde mit dem eingetragenen Gesamtmassenstrom an Butan in diesem Zeitintervall berechnet. In Tabelle 5 sind die variierten Prozessparameter aufgelistet und dabei die entsprechenden Einheiten angegeben.

Tabelle 5 : Prozessparameter mit Minimal-Werten und Maximal-Werten der Variation für die Charakterisierung der fermentativen Oxidation in Blasensäule

<i>Relevante Prozessparameter</i>	<i>Min.</i>	<i>Max.</i>
<i>Begasungsrate [L·min⁻¹ und vvm]</i>	0,25 / 0,125	1,5 / 0,75
➔ <i>Leerrohrgeschwindigkeit [cm·s⁻¹]</i>	0,8	5
<i>Temperatur [°C]</i>	25	40
<i>Butangehalt [% v/v]</i>	14	28
<i>Druck (absolut) [mbar]</i>	1100	1500
<i>Spezif. Glukosezufuhrtrate [g·g_{BTM}⁻¹·h⁻¹]</i>	0,06	0,8

Diese Einheiten werden in den folgenden Unterkapiteln aufgegriffen und durchgehend verwendet. Weiter sind zur Einordnung der Variation die Spannweite mit Minimalwert und Maximalwert der Parameter angegeben. Um das System entsprechend charakterisieren zu können, sollte die Butanaufnahmerate der Zellen größer sein, als der Butaneintrag/ Butantransfertrate ins Medium. Unter dieser Voraussetzung ist der Einfluss auf die volumetrische Produktivität, charakterisiert durch Variation der Prozessparameter, eindeutig dem physikalischen Butaneintrag ins Medium zuzuordnen. In Kapitel 6.2.1 wird deshalb zuerst die Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von der Zelldichte diskutiert und zusätzlich die Glukosezufuhr als limitierender Faktor ausgeschlossen.

6.3.1 Begasungsrate

Die Begasungsrate beschreibt den Volumenstrom des Gasgemisches, welcher pro Zeiteinheit in den Reaktor geleitet wird. Dabei kann die Begasungsrate absolut z.B. in Liter pro Minute [L·min⁻¹] oder relativ zum Reaktionsflüssigkeitsvolumen in vvm (Volumen pro Volumen und

Minute) angegeben werden wie es oft bei Fermentationen der Fall ist. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Begasungsrate zwischen $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ und $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt, was durch das initial eingesetzte Mediumvolumen von 2 Litern einen Bereich von $0,125 \text{ vvm}$ bis $0,75 \text{ vvm}$ bedeutet. Die Versuchsnummern sind #09, #10, #13, #15 und #23 und entsprechend unter Anhang 4 gegenübergestellt. Bei allen Versuchen kam ein Sinterzylinder mit $2 \mu\text{m}$ Porengröße und einer Länge von 38 mm bei 22 mm Durchmesser (30 cm^2 Oberfläche) zum Einsatz. Damit ergibt sich ein Volumenstrom pro Ausströmfläche von $0,14 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bis $0,83 \text{ cm}^3\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ als Vergleichswert für eine mögliche Skalierung.

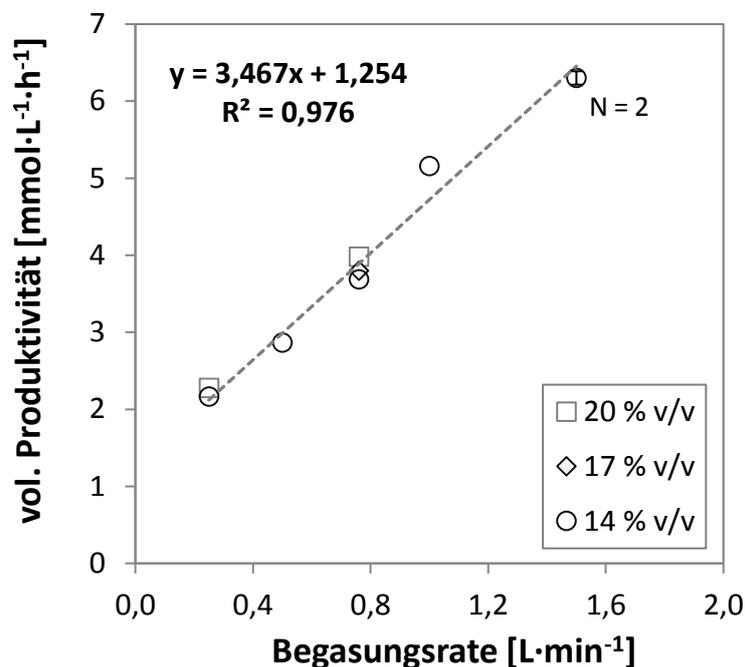


Abbildung 19 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von der Begasungsrate; Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C und $1,1 \text{ bar abs.}$, Zelldichten variieren von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 6,7 - 16,6$; Begasungsrate: $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;

Mit der Grundfläche der Blasensäule lässt sich die Begasungsrate zudem auf die Leerrohrgeschwindigkeit umrechnen und so beim Skalieren des Innendurchmessers besser vergleichen. Dementsprechend wurde die Leerrohrgeschwindigkeit von $0,8 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ bis $5,0 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ in den Versuchen dieser Arbeit variiert. Die Begasungsrate des Butan-Luft-Gemisches wurde mittels MFC geregelt und unter Einbezug des Butangehaltes und des Systemdrucks über die Prozesssteuerung angepasst. Durch Verwendung eines MFCs (max $1,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 1 bar und 14 % v/v) konnte der Volumenstrom auf weniger als $0,003 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ genau geregelt werden, was wiederum einem relativen Fehler von 1% entspricht. Im Folgenden wurde die Begasungsrate in sechs Versuchen (Kreise) variiert, wobei die Prozessparameter Temperatur (30°C), Druck ($1,1 \text{ bar}$) und Butananteil (14 % v/v) konstant

gehalten wurden. Abbildung 19 zeigt die volumetrische Produktivität bzgl. BuCOOH in Abhängigkeit der Begasungsrate. Der Versuch mit $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde zweimal durchgeführt mit der Mittelwert von $6,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von 1,4 % aufgetragen. Dieser Wert markiert das Maximum im untersuchten Bereich und lässt sich auf die Masse von Buttersäure bezogen zu $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ umrechnen.

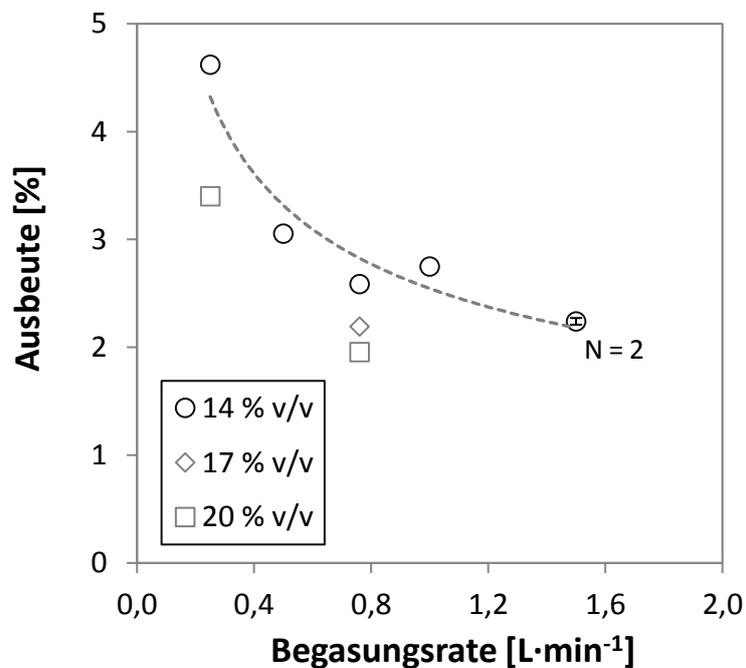


Abbildung 20 : Abhängigkeit der Ausbeute von der Begasungsrate - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C und 1,1 bar abs., Zelldichten variieren von $OD_{600nm} = 6,7 - 16,6$; Begasungsrate: $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;

Generell steigt die volumetrische Produktivität mit der Begasungsrate im betrachteten Bereich an und der Verlauf lässt sich über eine lineare Funktion ausreichend gut mit einem $R^2 = 0,98$ beschreiben. Die entsprechenden Werte der volumetrischen Produktivität wurden dabei durch zwei Versuche mit 20 % v/v Butan (Quadrate) bei $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ und $0,76 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bestätigt. Auch ein Versuch mit 17 % v/v Butan (Dreieck) deckt sich mit dem entsprechenden Verlauf bei 14 % v/v. Dabei nimmt der Anstieg der volumetrischen Produktivität nicht direkt proportional mit der Begasungsrate zu (vgl. Ordinatenschnitt der linearen Regression). Dieses ist damit zu erklären, dass es bei höheren Begasungsraten zu verstärkter Koaleszenz der Blasen am Begasungsadapter kommt. Ein freies Ablösen der einzelnen Gasblasen am Sinterzylinder wird unwahrscheinlicher und es kommt zu vermehrtem gegenseitigem Einfluss der Gasblasen. Durch erhöhte Koaleszenz sinken die spezifische Oberfläche und damit der Gaseintrag ins Medium, respektive die volumetrische Produktivität. Die unterproportionale volumetrische Produktivität bei hohen Begasungsraten führt dabei dazu, dass die über den

Gasstrom berechnete Ausbeute mit steigender Begasungsrate abnimmt (siehe Abbildung 20). Für die Berechnung der Ausbeute wird der Begasungsstrom mit dem Butananteil eingerechnet und daher erhält man eine geringere Ausbeute bei gleich hoher volumetrischer Produktivität aber höheren Butangehalten (Raute & Quadrate) geringer. Der Verlauf der volumetrischen Produktivität ist dabei auch über den entsprechenden Verlauf des k_{La} -Wertes nachzuvollziehen und abzubilden, welcher in Kapitel 6.6. übergreifend diskutiert wird. Dabei ist die Abhängigkeit des k_{La} -Wertes von der Begasungsrate größtenteils reaktorspezifisch. Hier spielen Dimensionen wie H/D-Verhältnis und Begasungsadapter eine entscheidende Rolle. Der durch die Versuche in diesem Reaktorsetup beobachtete Trend ist somit nur eingeschränkt übertragbar.

6.3.2 Butananteil

Der Butananteil im Mischgas mit synthetischer Luft wurde in dieser Arbeit über 14 % v/v, 17 % v/v, 20 % v/v, 23 % v/v, 26 % v/v und 28 % v/v variiert. Durch die obere Explosionsgrenze (OEG) von 9,8 % v/v von Butan in Luft wurde 14 % v/v als niedrigste Konzentration mit ausreichendem Sicherheitsabstand zur OEG gewählt (vgl. 4.3).

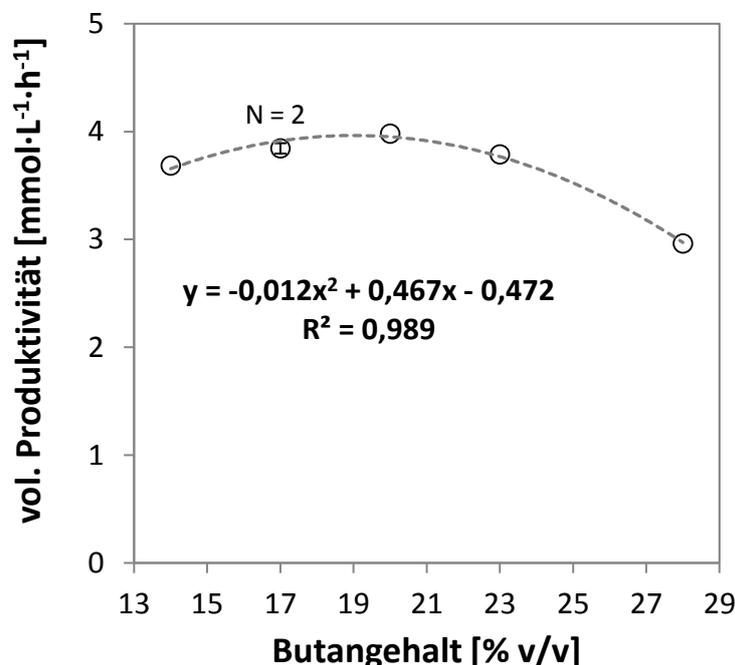


Abbildung 21 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität vom Butangehalt; Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; 1,1 bar abs.; 0,7 L·min⁻¹; Zelldichten variieren von OD_{600nm} = 5,1 - 14;

Mit steigendem Butananteil sinkt der Kondensationsdruck im Gasgemisch, was wiederum Einfluss auf den Fülldruck der Gasflasche von Herstellerseite bei 10°C festgelegt hat. So ergibt

sich bei 28 % v/v Butan in Luft ein Fülldruck von 5 bar absolut. Die Mischgasmenge in einer solchen Flasche reicht bei mittlerer Begasungsrate ($0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) nur noch für eine Versuchsdauer von drei Stunden, weshalb auf eine weitere Erhöhung der Butankonzentrationen verzichtet wurde. So wurde die Butankonzentration durch die Bereitstellung der entsprechenden Gasflasche festgelegt. Eine Änderung innerhalb eines Versuches ist nur durch Unterbrechung und Anschluss einer Gasflasche mit entsprechender Konzentration möglich. So ist für eine kontinuierliche zeitliche Änderung der Butankonzentration eine Gasmischstation notwendig, wobei dieser Punkt ausführlich im Kapitel Ausblick diskutiert wird.

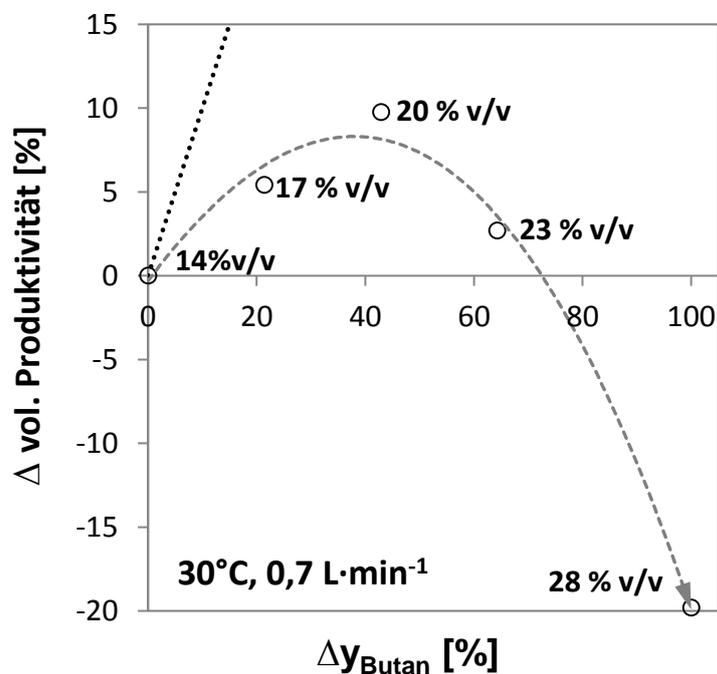


Abbildung 22 : Butanoxidation mit 2 L Medium bei 30°C , 1,1 bar abs. und $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei verschiedenen Butangehalten (14 % v/v – 28 % v/v); Prozentuale Differenz in vol. Produktivität und Butangehalt bezogen auf die Werte bei 14 % v/v; Theoretischer Mehreintrag an Butan ins Medium über Partialdruckanstieg und entsprechende Erhöhung des Konzentrationsgradienten (schwarzgepunktete Gerade)

Es wurden bei $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 30°C und 1,1 bar die Butankonzentration variiert. Abbildung 21 zeigt die volumetrische Produktivität in Abhängigkeit der Butankonzentration in der Gaszufuhr. Dabei ist ein marginaler Anstieg der volumetrischen Produktivität von $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit steigendem Butananteil bis zu 20 % v/v im Mischgas gegeben. Dieser Anstieg entspricht dabei nicht dem prozentualen Anstieg des Butanpartialdruckes bzw. nicht dem Anstieg der maximalen Löslichkeit C^*_{Butan} . So wäre zu erwarten, dass mit steigendem Butananteil/Partialdruck die maximale Löslichkeit steigt und damit der Konzentrationsgradient als Triebkraft für den Butantransfer ins Medium. Eine definierte

Erhöhung des Partialdruckes würde somit proportional eine dementsprechend prozentuale Erhöhung des Butantransfers ins Medium bzw. der volumetrischen Produktivität bedeuten. Diese Annahme beinhaltet, dass die Änderung des Butananteiles sich nicht auf die Blasengrößenverteilung und damit auf den $k_L a$ -Wert auswirkt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse aus Abbildung 21 diesbezüglich aufgetragen, indem der prozentuale Anstieg der volumetrischen Produktivität über den prozentualen Anstieg an Butan bezogen auf die niedrigste Butan-Luft-Mischung von 14 % v/v dargestellt ist.

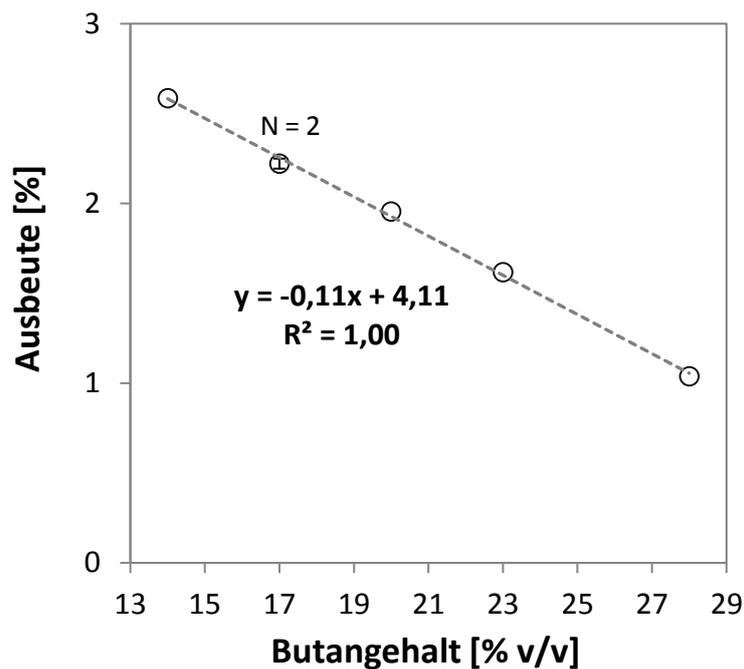


Abbildung 23 : Abhängigkeit der Ausbeute vom Butangehalt -- Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; Volumenstrom wurde so eingestellt, das der Volumenstrom trotz Änderung der Gasdichte äquivalent zu 0,76 L·min⁻¹ bei 100 mbar entsprechen; Zelldichten variieren von OD_{600nm} =12 - 14;

Im Falle einer idealen Annahme bezogen auf die Berechnung der Butantransfertrate (vgl. 4.1.1) sollte eine prozentuale Erhöhung der Butankonzentration zu einer ebenso großen prozentualen Erhöhung der volumetrischen Produktivität (beides bezogen auf die absoluten Werte bei 14 % v/v) führen. Die experimentellen Ergebnisse sollten unter dieser Annahme möglichst auf der Winkelhalbierenden (schwarz-gepunktete Gerade) liegen. Hierbei wird deutlich, dass die Annahme, eine Erhöhung des Partialdruckes hat eine Erhöhung des entsprechenden Stofftransportes zur Folge in diesem Fall nicht ausreichend zutrifft. Ab einem Butangehalt von 20 % v/v bis 28 % v/v ist im Gegensatz zur idealen Annahme eine Abnahme (grau gestrichelte Linie) der volumetrischen Produktivität bei steigendem Butangehalt ersichtlich (vgl. Abbildung 22). Hier führt eine weitere Erhöhung des Butananteils entgegen

des Anstieges des Partialdrucks zu einer Verringerung der volumetrischen Produktivität. Der verhältnismäßig geringere Eintrag an Butan ins Medium bei Erhöhung des Butananteils wird besonders bei der Auftragung der Ausbeute deutlich. Diese ist über den Butananteil in Abbildung 23 aufgetragen und zeigt für die Versuchsreihe mit $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 100 mbar, dass mit steigendem Butananteil die Ausbeute linear abnimmt. Hierdurch wird deutlich, dass eine Erhöhung des Butanpartialdruckes zur Steigerung der volumetrischen Produktivität nur bis 20 % v/v und nur einen geringen Beitrag besitzt. Wird die Ausbeute als Effizienzfaktor miteinbezogen, ist der Zuwachs an Produktivität durch die entsprechend geringere Ausbeute nicht zu begründen.

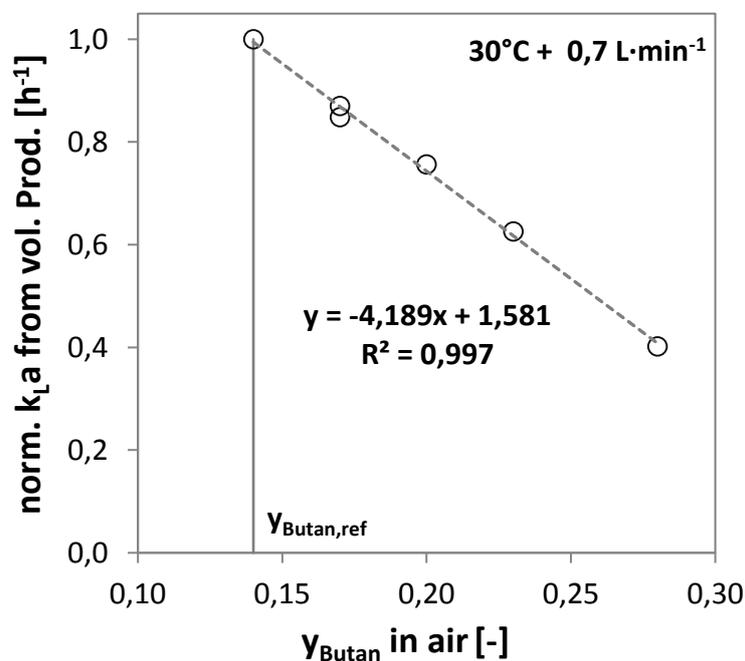


Abbildung 24 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes vom Butananteil normiert auf 14 % v/v; Versuche bei 30°C mit $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ und bei 1,1 bar

Die Abhängigkeit des normierten k_{La} -Wertes vom Butananteil ist in Abbildung 24 gezeigt ($k_{\text{La}} = 23,7 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ bei $y_{\text{Bu,ref}} = 0,14$). Dabei wird deutlich, dass dieser entgegen der klassischen Annahme nicht konstant bleibt, sondern sich mit steigendem Butangehalt verringert. Aus dem entsprechenden normalisierten Trend zum Referenz-Butananteil von 14 % v/v lässt sich somit eine Übertragung abschätzen. Eine Kombination mit weiteren Einflussfaktoren auf den k_{La} -Wert ist in Kapitel 6.6 aufgeführt und erlaubt so eine Übertragbarkeit zu anderen Reaktorkonzepten. Die Änderung des k_{La} -Wertes über den Butananteil der Gasmischung sollte dabei Gegenstand weiterer Forschung sein. Insbesondere bedarf es in diesem Zusammenhang einer weiteren Validierung und Messung der Blasengrößenverteilung. Dabei ist es von

Interesse, ob der Butangehalt die Blasengrößenverteilung und damit die Oberfläche a oder den Transportwiderstand k_L ändert.

6.3.3 Temperatur

Der Einfluss des Prozessparameters Temperatur auf die Produktivität und Ausbeute wird im Folgenden beschrieben und diskutiert. Dabei beeinflusst die Temperatur gleich mehrere Faktoren des Stofftransportes. Zum einen hängt die maximale Löslichkeit C^* direkt über die Henry-Gleichung (T01) von der Temperatur ab. Diese nimmt mit steigender Temperatur ab. Dementgegen nimmt die Diffusionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur zu. Hier sind also zwei entgegengesetzte Phänomene zu betrachten. Weiter hat die Temperatur Einfluss auf die Viskosität und Oberflächenspannung des Mediums und damit auf die Blasengrößenverteilung und die spezifische Oberfläche a im $k_L a$ -Term und damit letztendlich wiederum auf den Stofftransport. Um den Einfluss der Temperatur zu betrachten wurde eine Versuchsreihe mit 17 % v/v Butangehalt und einer Begasungsrate von $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ durchgeführt und die Temperatur im Bereich von $25,0 \text{ °C}$ bis $39,5 \text{ °C}$ variiert.

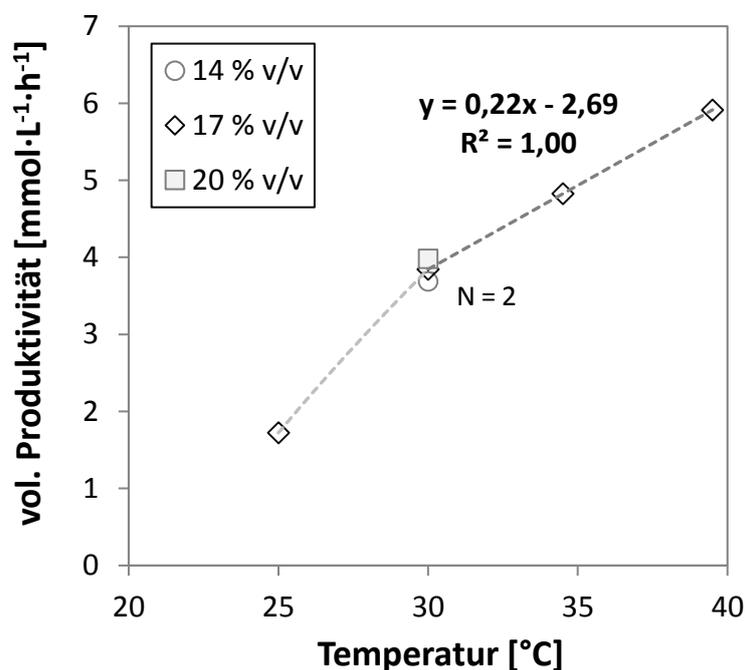


Abbildung 25 : Temperaturabhängigkeit der volumetrischen Produktivität - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30 °C ; $1,1 \text{ bar}$ und $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; Zelldichten variieren von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 11,7 - 15,2$.

Dabei sind in Abbildung 25 die volumetrische Produktivität in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass mit steigender Temperatur auch die volumetrische Produktivität steigt. Dieser Trend ist mit Betrachtung der Löslichkeit unerwartet, da diese mit

steigender Temperatur von 25 °C auf 39 °C um 15 % auf $0,09 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ abnimmt und der Trend damit entgegengesetzt zur volumetrischen Produktivität verläuft. Der Anstieg der volumetrischen Produktivität mit der Temperatur lässt sich also nicht über den Konzentrationsgradienten-Term der Stofftransportgleichung her begründen. Auch eine einzelne Betrachtung des Diffusionskoeffizienten reicht nicht aus. Dieser steigt von 25°C auf 39°C um ca. 40 % während die volumetrische Produktivität im selben Bereich um 172 % steigt. Der Einfluss der Temperatur auf den k_{La} -Wert ist in Kapitel 6.6 dargestellt und begründet die Zunahme des k_{La} -Wertes respektive der volumetrischen Produktivität mit steigender Temperatur. Mit der volumetrischen Produktivität steigt auch die Ausbeute mit der Temperatur. Der entsprechende Verlauf ist in Abbildung 26 dargestellt.

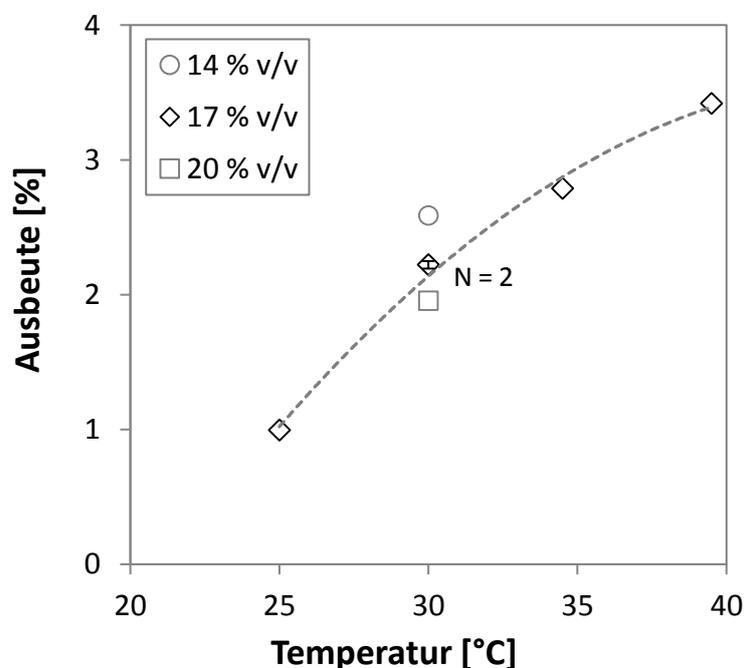


Abbildung 26 : Temperaturabhängigkeit der Ausbeute - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; 1,1 bar und $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; Zelldichten variieren von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 11,7, - 15,2$.

So verdreifacht sich die Ausbeute von 25 °C auf 39 °C. Da die Temperatur auf mehrere Komponenten des Stofftransports wirkt, ist eine differenzierte Betrachtung innerhalb dieser Arbeit nicht möglich. Weiter liegen die Versuchszeiten von maximal neun Stunden weit unterhalb von industriell relevanten Produktionszeiten. Inwieweit die gemessene Produktivität auch über längere Produktionszeiten konstant bleibt oder durch zellbedingten Aktivitätsverlust herabgesetzt wird, bleibt offen. Hier bedarf es Langzeitversuchen bei den entsprechenden Temperaturen. Zudem ist anzumerken, dass die Reaktionstemperaturen über entsprechende Temperaturrampen erreicht wurden ($\text{max. } 5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$) und ein direkter

Einsatz der Zellen bei höheren Temperaturen zu einem Aktivitätsverlust führen könnte. Die Zellen wachsen bei 37 °C in der Hochzelldichtefermentation wobei die Induktion bei 30 °C erfolgt. Mit den hier verwendeten Versuchszeiten limitiert durch die Begasungsdauer mit einer Gasflaschenfüllung konnte keine Desaktivierung über 8 Stunden festgestellt werden. Eine Untersuchung der Langzeitstabilität der Zellen auch bei höheren Temperaturen sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zudem wird ein langsames Aufheizen des Mediums zur Adaption generell empfohlen. Generell gilt es bei der Temperaturwahl auch die bei der industriellen Anwendung auftretenden Kosten der Temperierung zu berücksichtigen. So ist eine Kühlung großer Reaktoren unterhalb der Umgebungstemperatur mit einem hohen Energiebedarf bzw. Kühlwasserbedarf gekoppelt. Oft ergibt sich durch das sinkende Verhältnis von Oberfläche zu Volumen beim Skalieren ein Bedarf an Kühlleistung im Bereich der Fermentation, da die Zellaktivität einen Temperaturanstieg verursacht. In diesem Sinne ist eine erhöhte Temperatur nicht nur bzgl. der Energiekosten sinnvoll, sondern ist auch in Bezug auf Produktivität und Ausbeute zu favorisieren.

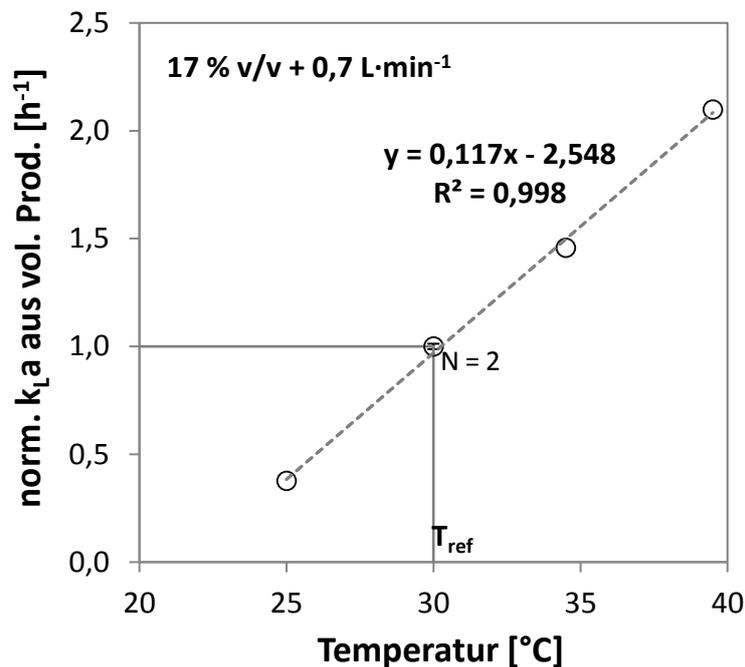


Abbildung 27 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes von der Temperatur; Butanoxidation in der Blasensäule; Normalisierung bzgl. des k_{La} -Wertes bei der Referenztemperatur von 30°C; Versuche mit 17 % v/v; 1,1 bar bei 0,7 L·min⁻¹; OD_{600nm} = 11,7 – 15,2.

Dabei kann der Einfluss der Temperatur auf den aus der vol. Produktivität berechneten scheinbaren k_{La} -Wert zur Übertragung genutzt werden. Dazu wird der k_{La} -Wert bei einer Referenztemperatur (T_{ref}) normiert und die weiteren k_{La} -Werte hierzu quantitativ in Bezug gesetzt. In Abbildung 27 ist der lineare Trend mit einem Regressionskoeffizienten von

$R^2 = 0,998$ entsprechend abgebildet. Aus diesem kann nun der k_{La} -Wert in Abhängigkeit der Temperatur abgeschätzt werden. Dazu wird der gemessene k_{La} -Wert bei einer Referenztemperatur von 30°C genutzt, um die k_{La} -Werte bei einer Temperatur T_i zu skalieren.

6.3.4 Systemdruck

Der Systemdruck wurde am Kopf der Blasensäule, also oberhalb des Flüssigkeitslevel im Gasraum gemessen und ist stets als Überdruck angegeben. Ein hier beschriebener Systemdruck von 300 mbar entspricht also einem Druck von 1300 mbar absolut. Dabei ist zu beachten, dass der Druckanstieg durch die Wassersäule am Blasensäulenboden für alle Experimente mit 2 L Medium 40 mbar beträgt. Beim Versuch mit 5 L Flüssigkeitsvolumen wird eine Füllhöhe von 95 cm erreicht, was wiederum einen Druckanstieg von 95 mbar am Boden der Blasensäule gegenüber dem gemessenen Systemdruck bedingt. Die Druckmessung im Kopf der Blasensäule hat dabei den praktischen Vorteil beim Arbeiten mit Organismen der Sicherheitsstufe 1, dass keine Kapillare zur Druckmessung benötigt wird, die eine chemische Desinfizierung erschweren würde. Die leichte Druckerhöhung von 100 mbar entsteht durch den Einsatz einer Waschflasche, welche der Blasensäule nachgeschaltet ist. Diese ist mit Wasser zu einer Füllhöhe von 50 cm gefüllt und das Abgas der Blasensäule wird über einen Sinterzylinder mit $20\ \mu\text{m}$ Porengröße durch diese Waschflasche geleitet. Dabei ergibt sich ein Druckverlust von 100 mbar bei $0,7\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate, welcher rückwirkend von der Waschflasche den Systemdruck der Blasensäule am Kopf bestimmt. Neben den Versuchen bei 100 mbar wurden zudem Versuche bei 300 mbar und 500 mbar Überdruck durchgeführt. Dazu wurde sowohl ein Nadelventil als auch eine Kapillare verwendet, um einen konstanten Druck über die Versuchszeit zu ermöglichen. Die Druckkonstanz lag dabei mit einem relativen Fehler von 2 % bei 300 mbar mit einem relativen Fehler von 3 % bei 500 mbar. Um die Versuche untereinander vergleichbar zu machen, wurde die volumetrische Begasungsrate von $0,76\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei Atmosphärendruck als Standard gewählt. Dabei ist zu beachten, dass durch den Druckanstieg auch die Gasdichte steigt und damit die Gasmenge bei gleichbleibendem Volumenstrom. Soll ein Volumenstrom von $0,76\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ohne Überdruck als Referenz gelten, bedeutet dieses, dass bei 300 mbar $0,83\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ und bei 500 mbar $0,95\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate vorliegen, wenn man den Gasstrom wieder auf Normaldruck entspannen würde. Bei 300 mbar ergibt das ein Plus von 18 % im Massenstrom und bei 500 mbar von 36 % im Massenstrom gegenüber dem Massenstrom ohne Überdruck und $0,76\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Es wurden Versuche mit 14 % v/v und 20 % v/v Butan durchgeführt und in Abbildung 28 ist die volumetrische

Produktivität in Abhängigkeit des Systemdruckes dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass die volumetrische Produktivität mit steigendem Systemdruck ansteigt, jedoch der Butananteil einen Einfluss auf die entsprechende Steigung hat. Im Falle der Versuche mit 14 % v/v (Kreise) wird durch eine Erhöhung des Druckes von 100 mbar auf 300 mbar bzw. 500 mbar ein Anstieg der volumetrischen Produktivität um 25 % bzw. 58 % auf 5,83 mmol·L⁻¹·h⁻¹ bei 500 mbar erreicht.

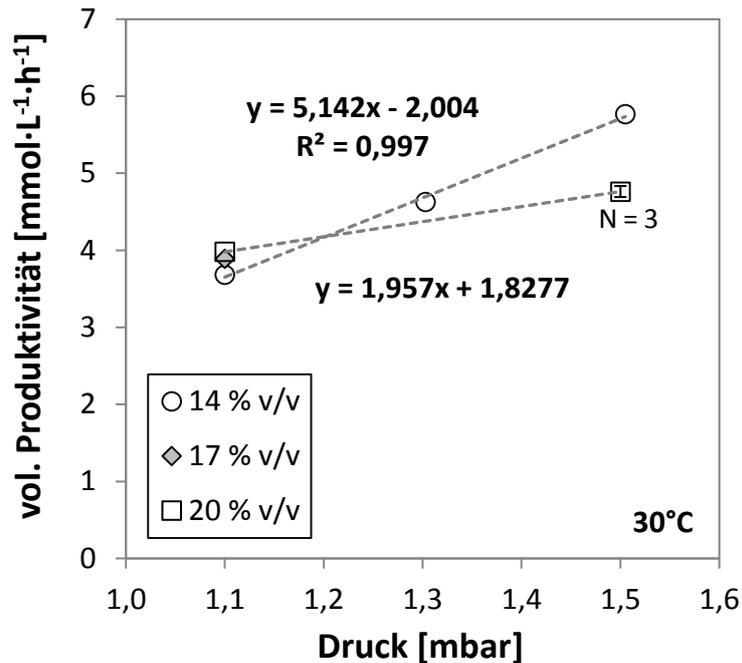


Abbildung 28 : Volumetrische Produktivität in Abhängigkeit des Systemdruckes - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; Volumenstrom wurde so eingestellt, dass der Volumenstrom trotz Änderung der Gasdichte äquivalent zu 0,7 L·min⁻¹ bei 1,1 bar abs. entsprechen; Zelldichten variieren von OD_{600nm} = 10 – 14.

In den Versuchen mit 20 % v/v beträgt die Erhöhung der volumetrischen Produktivität 19 % von 100 mbar auf 500 mbar. Das Maß des Einflusses, den der Systemdruck auf die vol. Produktivität hat, hängt damit deutlicher vom Butangehalt ab, als es der entsprechende Partialdruck erwarten lassen würde. Der Versuch mit 20 % v/v und 500 mbar wurde dreifach mit jeweils unterschiedlichen Zelldichten (OD_{600nm} = 10, 12,5 und 14) durchgeführt, um einen Einfluss durch das biologische System respektive die Butanaufnahmerate der Zellen und der Gelöstkonzentration von Butan im Medium ausschließen zu können. Dabei lag die volumetrische Produktivität reproduzierbar im Mittel bei 4,75 mmol·L⁻¹·h⁻¹ mit einem relativen Fehler von 0,74 %. Die volumetrische Produktivität bei 100 mbar und 17 % v/v liegt zwischen den vergleichbaren Werten für 14 % v/v und 20 % v/v. Eine Interpolation für den Anstieg der volumetrischen Produktivität in Abhängigkeit des Druckes für 17 % v/v sollte somit

mit ausreichender Aussagekraft möglich sein. Der Einfluss des Butangehaltes auf die Produktivität wird dahingehend weiter im Kapitel 6.6 diskutiert. Durch eine reine Erhöhung des Systemdruckes bleibt der Butangehalt [% v/v] konstant, solange ein ausreichender Abstand zum Kondensationsdruck bei der entsprechenden Temperatur eingehalten wird. Die Druckerhöhung kann sich dabei auf den k_{La} -Wert und damit auf den Butaneintrag über eine Änderung der Blasengrößenverteilung oder eine Änderung des Koaleszenzverhalten auswirken.

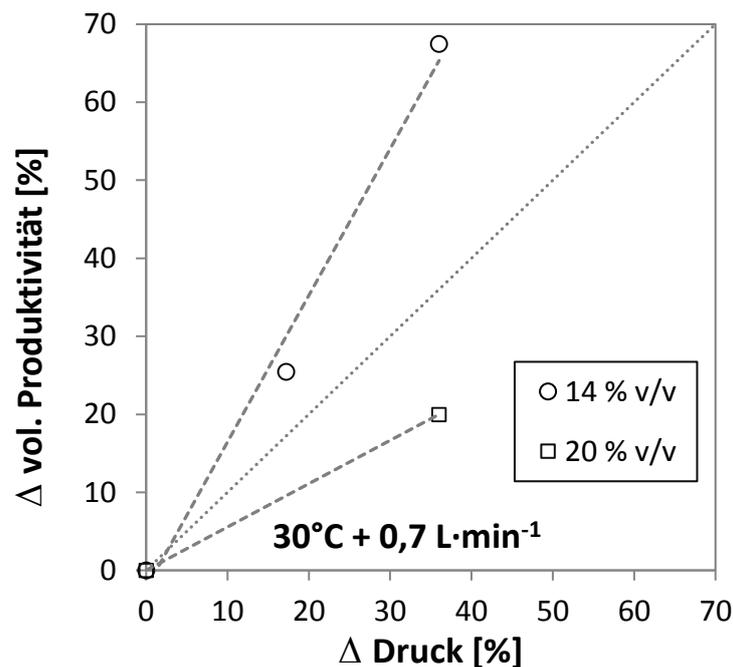


Abbildung 29 : Prozentualer Anstieg der volumetrischen Produktivität über den prozentualen Anstieg des System/Partialdruckes - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; Volumenstrom wurde so eingestellt, das der Volumenstrom trotz Änderung der Gasdichte äquivalent zu 0,7 L·min⁻¹ bei 1,1 bar abs. entsprechen; Zelldichten variieren von OD_{600nm} =10 – 14.

Zudem hängt die maximale Löslichkeit direkt proportional mit dem Partialdruck zusammen, welcher entsprechend mit dem Systemdruck ansteigt. Durch Auftragung des prozentualen Anstieges der volumetrischen Produktivität über den prozentualen Anstieg des System/Partialdruck lässt sich in Abbildung 29 keine direkte quantitative Aussage den zwei beschriebenen Effekten zuordnen. Bei den Versuchen mit 14 % v/v nimmt die volumetrische Produktivität stärker zu, als es der reine Anstieg des Systemdruckes respektive des Konzentrationsgradienten erwarten lassen würde. Bei den Versuchen mit 20 % v/v ist das Ergebnis gegenläufig. Hier steigt die volumetrische Produktivität prozentual weniger als der Systemdruck.

Eine Erhöhung des Butangehaltes von 14 % v/v auf 20 % v/v hat bei 500 mbar in den Experimenten eine signifikante Verringerung der volumetrischen Produktivität von 23 % zur Folge (vgl. Abbildung 29). Hier widerspricht das Experiment der idealen Annahme der Stoffeintragserhöhung durch Erhöhung des Partialdruckes. Auch eine zu geringe Aufnahmerate durch die Mikroorganismen kann hier ausgeschlossen werden, da auch mit steigender Zelldichte, die volumetrische Produktivität in diesem Fall konstant bleibt (siehe Abbildung 16). Die Verminderung des Butaneintrages bei größeren Butangehalten, hängt somit höchstwahrscheinlich mit dem Stofftransport über die Gasblasengrenzfläche ins Medium zusammen. So scheint mit steigendem Butananteil der $k_L a$ -Term der Stofftransportgleichung überproportional kleiner zu werden. Die maximale Löslichkeit C^* ist dabei direkt mit dem Partialdruck und der Temperatur verknüpft. Die Temperatur wurde bei allen Experimenten konstant auf 30°C gehalten und kann dabei als Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Der Partialdruck würde bei Erhöhung einen Anstieg des Butantransfers bedeuten, was experimentell nicht nachvollziehbar ist. Die Konzentration an gelösten Butan C_{Butan} geht in den Term des Konzentrationsgradienten ($C^*_{\text{Butan}} - C_{\text{Butan}}$) ein und kann somit auch Einfluss auf den Stofftransport ins Medium haben.

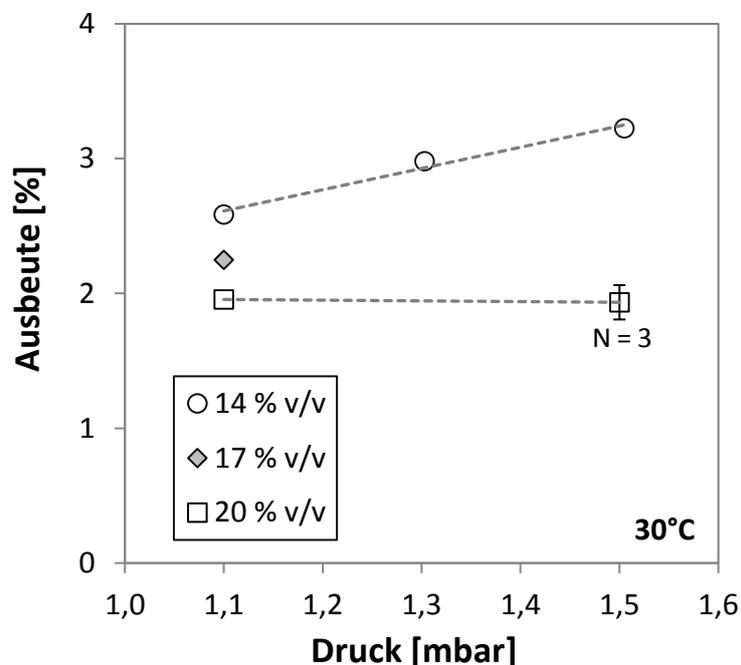


Abbildung 30 : Abhängigkeit der Ausbeute vom Systemdruck - Butanoxidation in der Blasensäule; Versuche mit 2 L Medium bei 30°C; Volumenstrom wurde so eingestellt, dass der Volumenstrom trotz Änderung der Gasdichte äquivalent zu 0,7 L·min⁻¹ bei 1,1 bar abs. entsprechen; Zelldichten variieren von OD_{600nm} = 10 - 14

Da durch die Erhöhung der Zelldichte um 40 % keine Erhöhung der volumetrischen Produktivität zu verzeichnen ist (vgl. Abbildung 16), kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Konzentration an gelöstem Butan (C_{Butan}) hierfür nicht signifikant ist. Eine reine Betrachtung des Einflusses des Systemdruckes auf den k_{La} -Wert ohne Berücksichtigung des Butangehaltes ist in Kapitel 6.6 diskutiert. Bei der Betrachtung der Ausbeute in Abbildung 30 wird ersichtlich, dass die Erhöhung des Druckes um 36 % auf 500 mbar bei den Versuchen mit 14 % v/v ein Anstieg um 26 % aufzeigt. Würde die Zunahme der volumetrischen Produktivität proportional zur Partialdruckzunahme sein, sollte die Ausbeute konstant bleiben. Da hier jedoch die vol. Produktivität überproportional zunimmt, steigt auch die Ausbeute mit höherem Druck. Bei den Versuchen mit 20 % v/v nimmt die volumetrische Produktivität bei 500 mbar unterproportional zum Partialdruck zu, weshalb in diesem Fall die Ausbeute um 3,6 % sinkt. Für die Versuche mit dem mittleren Butangehalt von 17 % v/v sollte der Trend durch Interpolation ausreichend gut abzubilden sein, da auch bei 100 mbar die Ausbeute bestimmt durch Interpolation zwischen 14 % v/v und 20 % v/v mit 3 % relativen Fehler vom experimentellen Wert von 2,05 % Ausbeute abweicht. Die Abhängigkeit des k_{La} -Wertes vom Systemdruck ist in Kapitel 6.6 übergreifend diskutiert.

6.3.5 k_{La} -Wert und Gasgehalt

Um den volumetrischen Stofftransportkoeffizient k_{La} für eine bestimmte Komponente zu bestimmen, muss diese im gelösten Zustand messbar sein. In den meisten Fällen wird deshalb der k_{La} -Wert für Sauerstoff bestimmt, da die Sauerstoffkonzentration mit verschiedenen Messprinzipien zuverlässig ermittelt werden kann. Für die Butanoxidation sind sowohl der Sauerstofftransport als auch der Butantransport ins Medium entscheidend. Der Sauerstofftransport kann dabei direkt über vorher gemessene k_{La} -Werte und die aktuelle Sauerstoffkonzentration bei bekannten Prozessparametern abgeschätzt werden. Für den Butantransport ins Medium konnte jedoch kein direkter k_{La} -Wert gemessen werden, da keine Methode zur Messung der Gelöstkonzentration an Butan zur Verfügung stand. Es wurden daher für verschieden Prozessparameterkombinationen der k_{La} -Wert bzgl. Sauerstoff bestimmt. Dabei sollten die Messungen möglichst unter Versuchsbedingungen durchgeführt werden, wie sie auch bei der fermentativen Oxidation vorkommen. Im Falle der Butanoxidation mit Zelldichten zwischen $\text{OD}_{600\text{nm}} = 8$ bis $\text{OD}_{600\text{nm}} = 15$, entsprechendem Sauerstoffbedarf der Zellen (OUR) und daraus resultierenden geringen Sauerstoffkonzentrationen im Medium von $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ bis $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ist die Messung

des k_{La} -Wertes schwer möglich. Versuche mit Medium jedoch ohne Zellen zeigten optisch deutliche Unterschiede in der Blasengrößenverteilung, weshalb die k_{La} -Messungen mit Zellen aber ohne Glukosezufuhr und mit Luftbegasung durchgeführt wurden. Dabei konnte ein Einfluss der Butankonzentration auf den k_{La} -Wert nicht untersucht werden. Auch die Position der Messstelle beeinflusst die k_{La} -Messung, da besonders im unteren Bereich deutlich höhere Turbulenz beobachtet werden kann. Die Messstelle wurde deshalb ca. auf halber Flüssigkeitshöhe (ohne Begasung) gewählt. Aufgrund der Verwendung eines optisch aktiven Klebemesspunktes konnte die Sauerstoffmessung dabei nur direkt an der Reaktorwand durchgeführt werden. Hier kann es auch zu Konzentrationsgradienten entlang des Blasensäulenradius kommen, wobei in dem betrachteten Maßstab (8 cm Innendurchmesser) dieser zu vernachlässigen ist. Der Abhängigkeit des k_{La} -Wertes von der Begasungsrate/Leerrohrgeschwindigkeit ist in Abbildung 31 gezeigt.

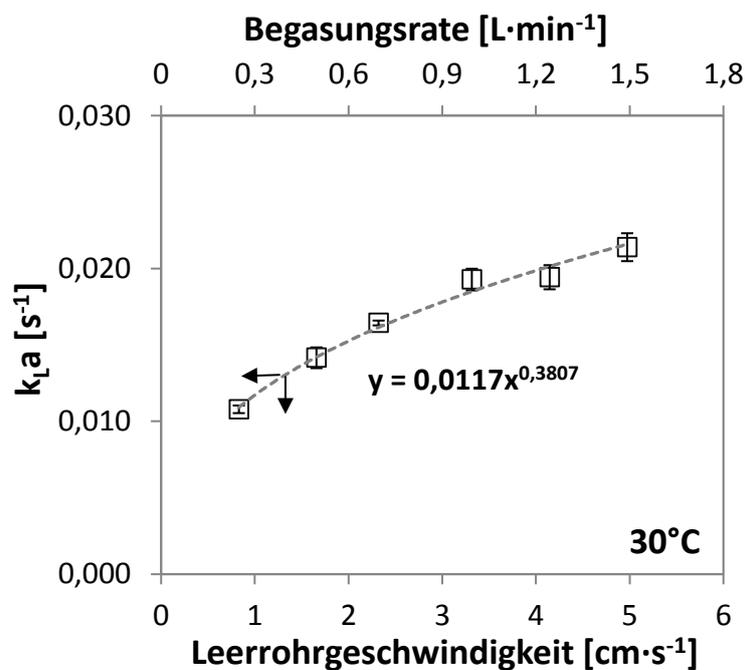


Abbildung 31 : k_{La} -Wert in Abhängigkeit von der Leerrohrgeschwindigkeit/Begasungsrate mit Luft bei 2 L Medium mit OD600nm = 11 ohne Glukosezufuhr; N = 3; 30°C und 1,1 bar (abs.); optische Messung auf halber Flüssigkeitshöhe (ca. 20 cm vom Säulenboden an der Reaktorwand).

Die entsprechenden Abhängigkeiten des k_{La} -Wertes von den Prozessparametern Begasungsrate, Temperatur und Druck und die Übertragbarkeit bzgl. der zugehörigen volumetrischen Produktivität sind in Kapitel 6.6 übergreifend diskutiert.

6.3.6 Sauerstoffkonzentration im Medium

Zur Oxidation von Butan zur Buttersäure und für den Erhaltungsstoffwechsel der Mikroorganismen wird Sauerstoff benötigt. Dabei kann dieser theoretisch limitierend werden und dadurch die theoretische volumetrische Produktivität herabsetzen. Die Konzentration an im wässrigen gelösten Sauerstoff $c_{O_2}^{aq}$ lag bei allen Oxidationsexperimenten dieser Arbeit zwischen $0,011 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $0,151 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Da die polarographische Sauerstoffsonde in allen Experimenten bei Atmosphärendruck und 30°C kalibriert wurde entspricht dieses eine Spannbreite von 4,5 % bis 60 % Gelöstsauerstoff. Die Auftragung der volumetrischen Produktivität über die in den jeweiligen Experimenten gemittelte Menge an gelöstem Sauerstoff ist in Abbildung 32 gezeigt.

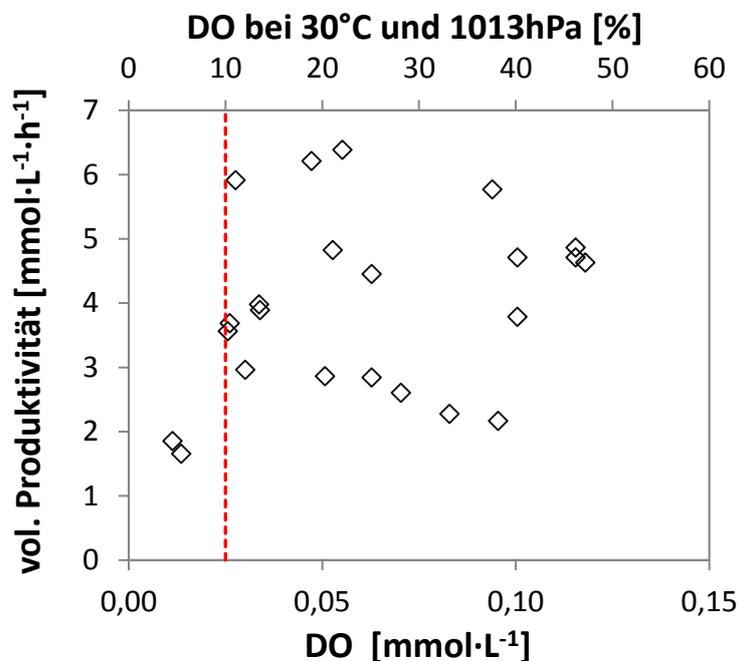


Abbildung 32 : Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration DO (dissolved oxygen) auf die volumetrische Produktivität; Auftragung des DO aus allen für die Charakterisierung verwendeten Versuchen. Die Versuche unterhalb der DO-Grenze $< 0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ waren sauerstofflimitiert; zu geringe vol. Produktivität als aus der jeweiligen Prozessparameterkombination resultieren sollte.

Dabei wird ersichtlich, dass ab einer Sauerstoffkonzentration von $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. 10 % (bei 30°C und 1 atm) volumetrische Produktivitätsraten von bis zu $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ möglich sind. Diese volumetrische Produktivität entspricht ca. 94 % der maximal gemessenen Produktivität, weshalb in diesem Versuchsrahmen ein minimales Sauerstofflevel von $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ als ausreichend konservativ gewählt wurde. Bei einer weiteren Erhöhung der volumetrischen Produktivität kann der gelöste Sauerstoff limitierend werden, weshalb eine weitere Betrachtung bei Erhöhung der Produktivität unabdingbar ist.

6.4 Charakterisierung des Prozessfensters

Aus der Charakterisierung des Prozesses ergeben sich damit für die verschiedenen Prozessparameter (vgl. 6.3) folgende Zusammenhänge für die Approximation der volumetrischen Produktivität P_{vol} in $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Zusammenhänge sind dabei empirischer Form, weshalb keine direkte Gesetzmäßigkeit bzgl. der Einheiten vorliegt. Um mit den Einheiten der Prozessparameter korrekt auf die volumetrische Produktivität umrechnen zu können, haben die Regressionsparameter entsprechende Einheiten zugewiesen bekommen. Die Begasungsrate \dot{V} in $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ hat danach den nachfolgenden Einfluss auf die volumetrische Produktivität $P_{vol}^{\dot{V}}$, wobei hier ein linearer Ansatz mit einem R^2 von 0,98 gewählt wurde.

$$P_{vol}^{\dot{V}} = 208,02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-2} \cdot \dot{V} + 1,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad [\text{E01}]$$

Weiter wurde der Einfluss des Butangehaltes in % v/v auf die volumetrische Produktivität bestimmt, wobei dieser als skalierender Term ohne Einheit umgerechnet wurde. Die Basis dafür bildet ein Interpolationspolynom 2. Grades mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,99$. Die entsprechende Änderung der volumetrischen Produktivität bei steigendem Butangehalt wurde auf den niedrigsten Butangehalt von 14 % v/v normiert und als Faktor ausgedrückt, welcher den zuvor beschriebenen $P_{vol}^{\dot{V}}$ skaliert. Der signifikant verringere Einfluss des Butangehaltes bei höherem Druck wird im Rechenterm zum Butangehalt vernachlässigt, da der entsprechende Zusammenhang aus Abbildung 21 im nachfolgenden Druckterm P_{vol}^P berücksichtigt wird. Es folgt damit die folgende Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität vom Butangehalt y_{bu} in $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ als Skalierungsterm.

$$k_{Butan} = \left(1 + \frac{(-122,70 \cdot y_{Butan}^2 + 46,65 \cdot y_{Butan} - 0,47) - 3,71}{3,71} \right) \quad [\text{E02}]$$

Den Einfluss des Prozessparameters Druck auf die volumetrische Produktivität wurde in Abhängigkeit des Butangehaltes definiert, da dieser einen signifikanten Einfluss hat. So verringert sich der spezifische Anstieg der Produktivität mit dem Druck mit zunehmendem Butangehalt. Die Abhängigkeiten der volumetrischen Produktivität vom Druck p [bar] und Butangehalt y_{Bu} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$] sind damit wie folgt vereinfacht beschrieben.

$$P_{vol}^P = (p - 1,1) \cdot (-53,08 \cdot y_{Butan} + 12,57) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1} \quad [\text{E03}]$$

Der Einfluss der Temperatur T in $^{\circ}\text{C}$ auf die volumetrische Produktivität wurde nur mit 17 % v/v untersucht, jedoch zeigen die Versuche bei $0,7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, dass hier auch bei anderen

Butangehalten die Werte gering streuen. Der entsprechende Einfluss der Temperatur auf die Volumetrische Produktivität ist damit als P_{vol}^T in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ gegeben.

$$P_{vol}^T = 0,22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1} \cdot (T - 30 \text{ }^\circ\text{C}) \quad [\text{E04}]$$

Zusammengefasst ergibt sich folgender Zusammenhang zur Approximierung der volumetrischen Produktivität P_{vol} [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] in Abhängigkeit der physikalischen relevanten Prozessparameter.

$$P_{vol} = P_{vol}^{\dot{V}} \cdot k_{Butan} + P_{vol}^P + P_{vol}^T \quad [\text{E05}]$$

Wobei durch einsetzen der oben definierten Teilterme folgender Ausdruck entsteht. Dabei sind die Einheiten der jeweiligen Parameter und Konstanten die vorherigen Gleichungen E01 bis E04 zu entnehmen. Zudem erfolgte hier eine Umrechnung der Begasungsrate auf $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ und des Butangehaltes auf % v/v. Dieser Ausdruck ist daher nicht direkt über die Einheiten aufzulösen, erlaubt aufgrund seines empirischen Charakters jedoch eine simple Anwendung bei gleichem Endergebnis.

$$P_{vol} = (3,47 \cdot \dot{V} + 1,25) \cdot k_{Bu} + (p - 1,1) \cdot (-0,558 \cdot y_{Bu} + 13,117) + 0,22 \cdot (T - 30) \quad [\text{E06}]$$

Die Prozessparameter Zelldichte und spezifische Glukosezufuhrtrate sowie die daraus mit resultierende Sauerstoffkonzentration werden im Folgenden als Grenzwerte definiert.

Dabei kann nach einer Abschätzung der volumetrischen Produktivität die Zelldichte c_X [$\text{g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$] über die spezifische Aktivität a_{sp} [$\text{mmol}\cdot\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] bestimmt werden.

$$c_X = \frac{P_{vol}}{a_{sp}} \quad [\text{E07}]$$

Hierzu sollte die angenommene maximale spezifische Aktivität der Zellen, so wie die in dieser Arbeit festgelegt, folgenden Grenzwert nicht überschreiten.

$$a_{sp} \leq 0,8 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad [\text{E08}]$$

So wird sichergestellt, dass die Butanaufnahme größer ist als der Butaneintrag und das System durch den Stofftransport von der Gasblase ins Medium limitiert ist. Mit der hieraus berechneten Zelldichte kann nun die spezifische Glukosezufuhrtrate (vgl. Abbildung 17) ermittelt werden.

$$\dot{F}_{Glukose} \geq 0,08 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad [\text{E09}]$$

Mit den physikalischen Prozessparametern können nun der Sauerstoffeintrag und der Sauerstoffverbrauch durch die Zellen bei der gewählten Glukosezufuhr rate bestimmt werden. Damit ergibt sich die resultierende Konzentration an im Medium gelösten Sauerstoff $c_{O_2}^{aq}$ [mmol·L⁻¹]. Dabei sollte für den in dieser Arbeit untersuchten Bereich der volumetrischen Aktivität folgende Minimalkonzentration (vgl. Abbildung 32) beachtet werden.

$$c_{O_2}^{aq} \geq 0,025 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \approx 30\% \text{ DO bei } 30^\circ\text{C und } 1013 \text{ hPa} \quad [\text{E10}]$$

Mit der jeweiligen Volumetrischen Produktivität ergibt sich mit dem über die Prozessparametereinstellungen definierten molaren Strom an Butan in den Reaktor die Ausbeute. Mit der Berechnung der Volumetrischen Produktivität und zugehöriger Ausbeute lässt sich nun für alle Parameterkombinationen das Prozessfenster bestimmen. Dieses ist für die in dieser Arbeit verwendeten Blasensäulenreaktoren und den Wertebereichen der Prozessparameter aus Tabelle 5 in Abbildung 33 dargestellt.

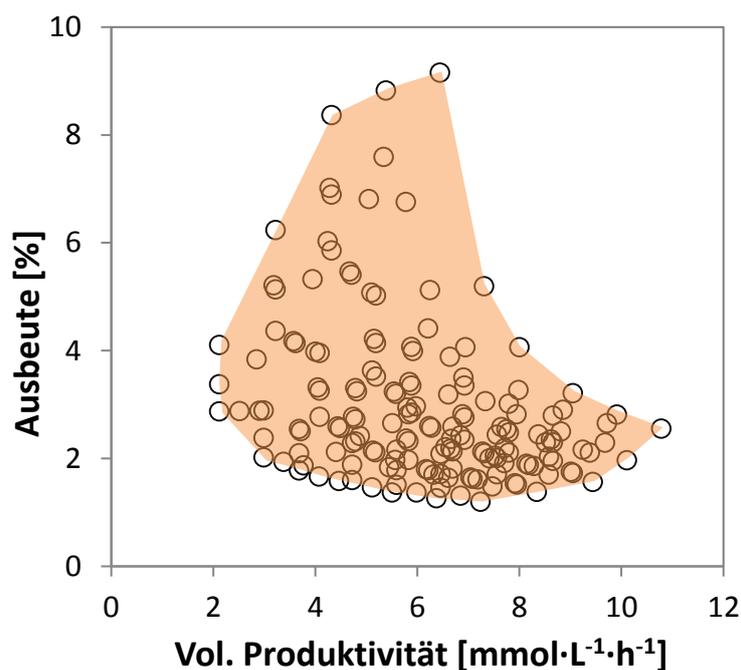


Abbildung 33 : Prozessfenster für den betrachteten Blasensäulenreaktor; relevante Prozessparameter sind die Begasungsrate (0,25; 0,5; 0,7; 1; 1,5 [L·min⁻¹]); Temperatur (25; 30; 35; 40 [°C]); Druck (1,1; 1,3; 1,5 [bar]) und Butangehalt (14, 17, 20 [% v/v]); Alle sich daraus ergebenden Prozessparameter-Kombinationen sind dargestellt bzgl. ihrer resultierenden vol. Produktivität und Ausbeute.

Zur Validierung der Charakterisierung wurde eine Butanoxidation durchgeführt, bei der die volumetrische Produktivität im Rahmen der apparativen Möglichkeiten maximiert werden sollte. Aus den Trends der einzelnen Prozessparameter ergeben sich im betrachteten Prozessfenster damit folgende Parametereinstellungen. Die Prozessparameter wurden mit

14 % v/v Butan mit $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate bei 500 mbar Überdruck und 35°C festgelegt. Aus der oben beschriebenen Prozessfensterberechnung (Gleichung E06) ergibt sich mit diesen Werten eine volumetrische Produktivität von $9,33 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Mit der oben genannten minimalen Zellaktivität ergibt sich eine Sollzelldichte von $11,6 \text{ g}_{\text{BTM}}\cdot\text{L}^{-1}$ zusammen mit einer Sollzufuhr rate von $0,93 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ Glukose. Der entsprechende Versuch ergab durch Regression über fünf Datenpunkte mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ eine volumetrische Produktivität von $9,37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Dieser Wert weicht nur geringfügig um 0,4 % vom zuvor berechneten Wert für die verwendeten Parametereinstellungen ab.

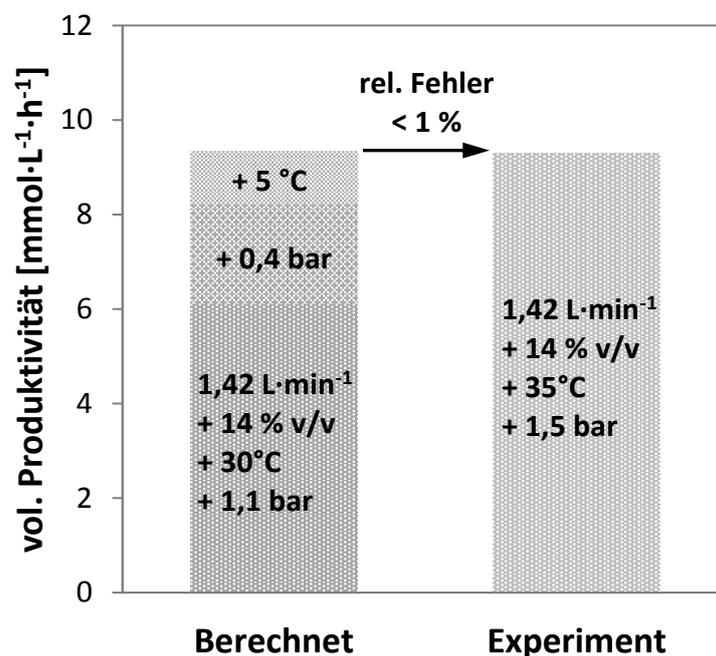


Abbildung 34 : Vergleich des Ergebnisses der Berechnung auf Basis der Charakterisierung und dem Ergebnis des dazugehörigen Experimentes; 2 Liter Medium bei 35°C und $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit $14\% \text{ v/v}$ bei $1,5 \text{ bar}$; Die Berechnung ergab für die Parametereinstellung eine volumetrische Produktivität von $9,33 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und die experimentelle Validierung ergab eine volumetrische Produktivität von $9,37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von $0,4\%$.

6.4.1 Mischzeit

Versuche mit Farblösung (Malachitgrün) wurden mittels Videokamera durchgeführt und die Zeit bis zum Erreichen eines subjektiv wahrgenommenen Farbgleichgewicht bestimmt. Diese Mischzeit lag bei einer Begasungsrate von $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bzw. $0,5 \text{ vvm}$ bei ca. 6 - 10 Sekunden, je nachdem, ob die Farblösung an der Flüssigkeitsoberfläche am Rand oder in der Mitte injiziert wurde. Diese Mischzeit zeigt die hohe Durchmischung in der 2 L Laborblasensäule. Bei einer Skalierung ist diese nicht aufrecht zu erhalten, da mit der Säulenhöhe die Verweilzeit unter Berücksichtigung der Blasengrößenverteilung in den meisten Fällen mit der Mischzeit steigt.

6.5 Abschätzung der Skalierungs-Kompatibilität

Durch die Erhöhung des H/D-Verhältnis steigen die Verweilzeit der Gasblasen und damit auch die Dauer für den Transfer des Butans von der Blase ins umgebende Medium. Im idealisierten Fall würde eine Blase dabei eine längere Wegstrecke bis zur Flüssigkeitsoberfläche zurücklegen müssen und, vorausgesetzt die Blasengröße bliebe konstant und damit auch die Aufstiegsgeschwindigkeit, würde ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen Verweilzeit und Blasensäulenhöhe bestehen. Idealisiert betrachtet, würde durch die Verdopplung der Steighöhe auch die Verweilzeit verdoppelt und die Ausbeute ebenso. Dabei treten verschiedene Effekte auf, welche diese idealisierte Betrachtung einschränken. Zum einen verringert sich der Druck der Flüssigkeitssäule auf die Blase beim Aufsteigen. Hierdurch dehnt sich die Blase aus und der Blasendurchmesser nimmt zu. Mit zunehmender Blasengröße steigen auch die Auftriebskraft und damit die Aufstiegsgeschwindigkeit, was wiederum zu einer Abnahme der Verweilzeit pro Steighöhe führt. Mit einer Verdoppelung der Füllhöhe geht somit nicht eine Verdoppelung der Verweilzeit hinzu. Weiter ist bei einer höheren Verweilzeit auch statistisch gesehen das Koaleszenz-Potential größer, was durch die steigende Blasengröße weiter erhöht wird.

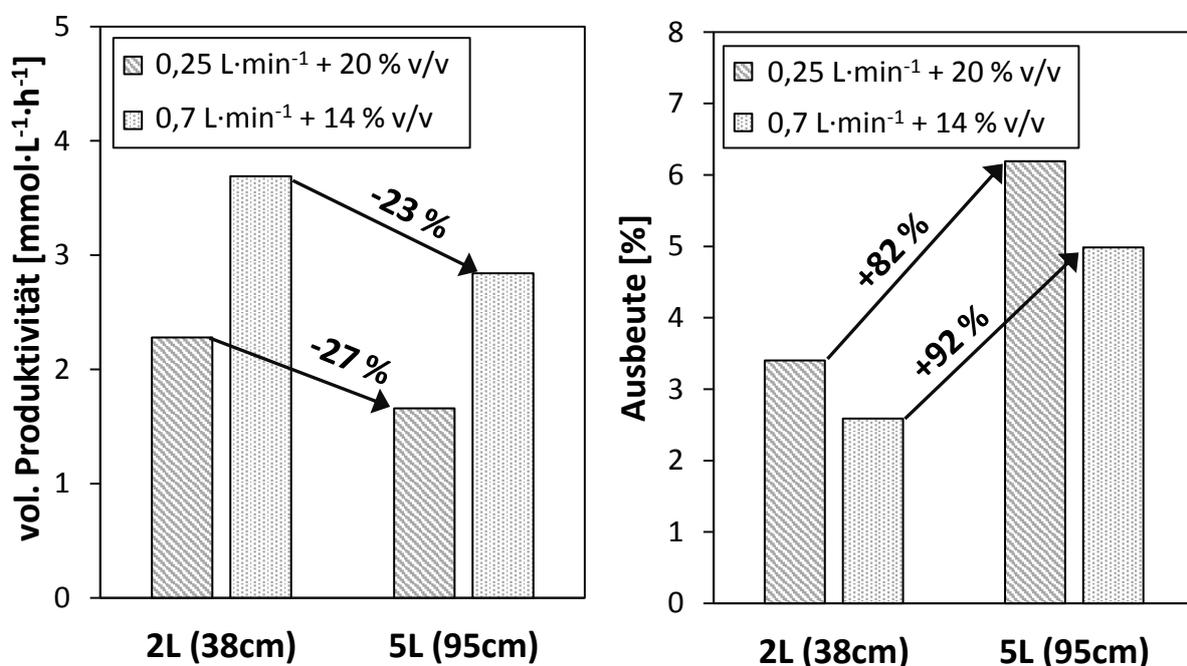


Abbildung 35 : Abhängigkeit der vol. Produktivität und der Ausbeute von der Skalierung des H/D-Verhältnisses; 0,25 L·min⁻¹ mit 20 % v/v und 0,7 L·min⁻¹ mit 14 % v/v bei 30 °C; Bei 2 L: H/D = 4,75; bei 5 L: H/D = 11,9.

Zudem verändert sich das Strömungsprofil innerhalb der Blasensäule. Während im unteren Teil, den ersten 38 cm Füllhöhe bei 2 L (Standardbedingungen innerhalb dieser Arbeit) ein

heterogenes Strömungsbild vorliegt und viele Verwirbelungen auftreten, ist im oberen Teil der Blasensäule bis zu 95 cm Füllhöhe (5 L Mediumvolumen) ein homogeneres Strömungsbild zu erkennen. Hier sind weniger Verwirbelungen sichtbar und die Strömung steigt im Inneren der Säule aufwärts während am Rand der Säule die Gasblasen auch nach unten getrieben werden. Die Turbulenz ist dabei im kleineren Maßstab von 2 L sichtbar größer als im oberen Teil des 5 L Maßstabes. Die Turbulenz wirkt sich positiv auf den Stofftransport aus, da dadurch die Grenzschicht zwischen den Phasengrenzen verkleinert wird und damit der Transportwiderstand abnimmt. Daher ist zu erwarten, dass die volumetrische Produktivität im 2 L Maßstab höher ausfällt als bei 5 L mit homogenerem Strömungsbild im oberen Teil der Blasensäule. Um eine erste Abschätzung des Skalierungspotentials vorzunehmen, wurde ein Versuch mit größerem H/D-Verhältnis durchgeführt. Dabei wurden zwei Blasensäulen-Glaskörper übereinander angeordnet. Dadurch ergibt sich eine Füllhöhe von 95 cm bei 5 L Medium ohne Begasung. Als Prozessparameter wurden $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate mit 20 % v/v Butan und $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 14 % v/v jeweils bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 100 mbar gewählt, wobei zum Vergleich Versuche mit denselben Prozessbedingungen und 2 L Medium (Normalbedingungen) durchgeführt wurden. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 35 gezeigt. Dabei wird ersichtlich, dass durch die Erhöhung des Volumens respektive der Füllhöhe um 250 % die volumetrische Produktivität um 23 % (27 %) gegenüber den Versuchen mit 2 L Medium sinkt. Trotz der verringerten Produktivität steigt die Ausbeute um 92 % (82 %) auf über 6 % beim Versuch mit 5 L (95 cm Füllhöhe) und $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Eine erste Abschätzung mit dem Trend des Anstieges an Ausbeute pro Blasensäulenhöhe wird in der übergreifenden Diskussion (6.6) vorgenommen.

6.6 Übergreifende Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus 6.3 und 6.4 übergreifend diskutiert. Während davor die einzelnen Prozessparameter oft getrennt voneinander betrachtet und diskutiert wurden, besteht oft eine gegenseitige Beeinflussung der Parameter. Deshalb ist es wichtig, diese im Hinblick auf eine industrielle Anwendung kombiniert zu diskutieren. Innerhalb der übergreifenden Diskussion wird besonders die Übertragbarkeit thematisiert.

6.6.1 Übertragbarkeit auf Basis des k_{La} -Wert

Für die relevanten Prozessparameter Temperatur T (6.3.3), Druck p (6.3.4), Begasungsrate \dot{V} (6.3.1) und Butangehalt y_{Butan} (6.3.2) kann mit dem k_{La} -Ansatz eine Übertragbarkeit evaluiert werden. Zudem lassen sich die unterschiedlichen Trends aus der Charakterisierung bzgl. einer Anwendung in einem industriellen Prozess diskutieren.

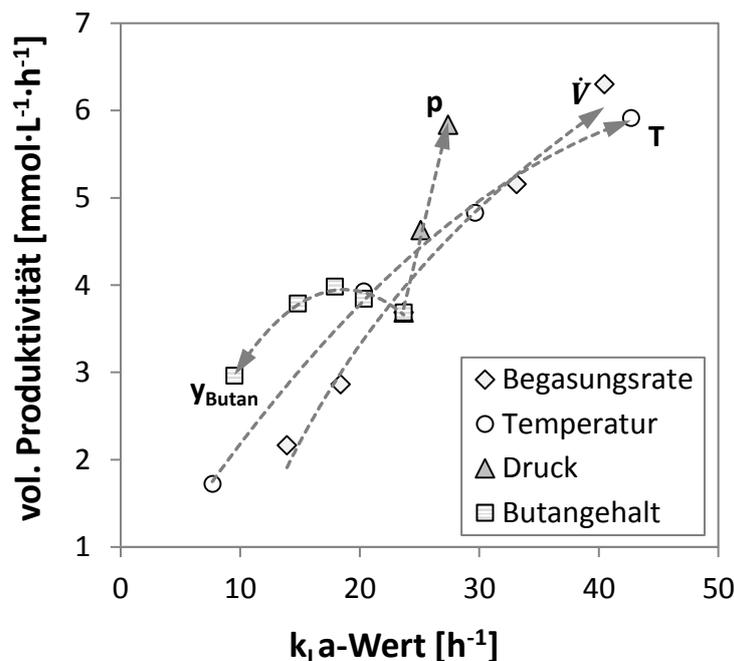


Abbildung 36 : Mit der experimentellen volumetrischen Produktivität berechnete k_{La} -Werte für die verschiedenen Versuchsreihen; minimal und maximal Werte der einzelnen Versuchsreihen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Aus der volumetrischen Produktivität als minimal bzw. mindestens eingetragene Butantransfertrate und über die für jeden Versuch entsprechend berechnete maximale Löslichkeit von Butan (vgl. 4.1.1) kann ein k_{La} -Wert abgeschätzt werden. Der sich dabei ergebene k_{La} -Wert ist in Abbildung 36 für die verschiedenen Versuchsreihen der Prozessparameterstudie in Abhängigkeit der Produktivität angegeben. Der Ansatz der Stofftransfertrate mit k_{La} -Wert und Löslichkeitsgradienten (vgl.4.1.1) stellt hierbei ein

klassisches Beispiel dar. Für den Fall der **Begasungsrate** passt diese Abschätzung mit den experimentellen Daten überein. Je höher (Pfeilrichtung im Diagramm) die Begasungsrate \dot{V} , desto höher der k_{La} -Wert (vgl. Abbildung 31 sowie Abbildung 36 und Abbildung 37) und desto höher der Butantransfer ins Medium, respektive die volumetrische Produktivität (vgl. Abbildung 19). Auch der leicht abflachende Verlauf der volumetrischen Produktivität mit steigender Begasungsrate kann aufgrund der Koaleszenz und damit nicht linear zunehmenden spezifischen Oberfläche begründet werden. Zudem zeigen die Versuche mit anderen Butangehalten oberhalb der bei den Experimenten zur Bestimmung des Begasungsrateneinflusses verwendeten 14 % v/v eine Übereinstimmung mit dem resultierenden Trend. Der Einfluss und Trend der Begasungsrate folgt damit dem verfahrenstechnischen Grundverständnis und lässt sich mit dem k_{La} -Wert über die Stofftransfer rate qualitativ abbilden. Dabei können zur quantitativen Übertragbarkeit des mit Sauerstoff gemessenen k_{La} -Wertes auf den k_{La} -Wert bzgl. Butan verschiedene Modellannahmen zugrunde gelegt werden.

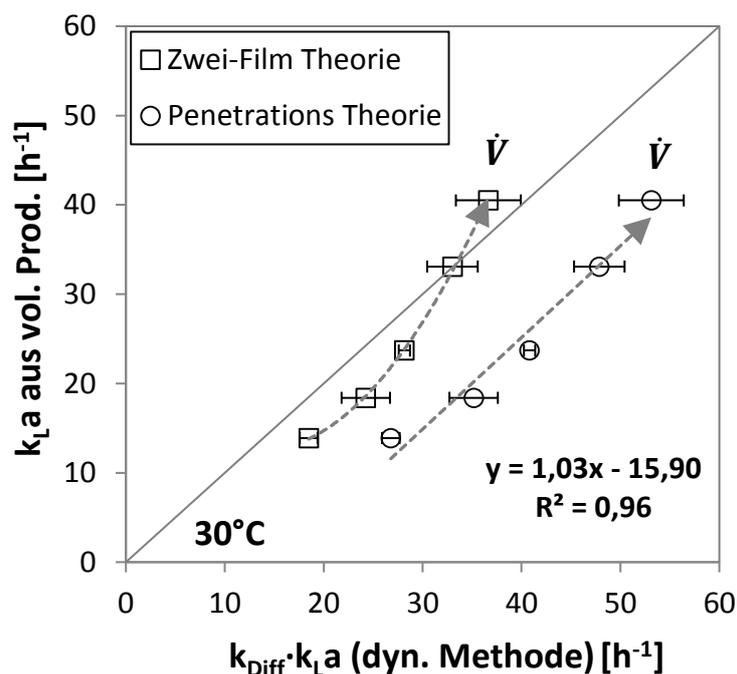


Abbildung 37 : k_{La} -Wert berechnet aus vol. Produktivität in Abhängigkeit des mit Sauerstoff gemessenen k_{La} -Wertes; Skalierung des gemessenen k_{La} -Wertes über zwei Modelltheorien; N=3 bei der Messung mit dynamischer Messmethode.

So kann mit den Prozessparametern Partialdruck und Temperatur auf die maximale Löslichkeit von Butan im jeweiligen Versuch geschlossen werden (vgl. 4.1.1). Aus dem Quotienten aus volumetrischer Produktivität und maximaler Löslichkeit ergibt sich der scheinbare k_{La} -Wert bzgl. Butan. Dieser kann nun in Abhängigkeit des mit Luftsauerstoff über die dynamische

Methode gemessenen k_{La} -Wertes aufgetragen werden, welcher zusätzlich den Unterschied der Diffusionskoeffizienten miteinbezieht. Dabei muss für die Übertragbarkeit ein Modell zur Umrechnung der Diffusionskoeffizienten herangezogen werden. In Abbildung 37 sind die k_{La} -Werte aus der vol. Produktivität den mittels dynamischer Methode gemessenen und mittels Zwei-Film-Theorie und Penetrations-Theorie skalierten k_{La} -Werten gegenübergestellt. Bei der Penetrationstheorie wird die Wurzel des Quotienten der Diffusionsquotienten aus der Zwei-Film-Theorie (vgl. 4.1.1) für die Skalierung des mit Luftsauerstoff gemessenen k_{La} -Wertes verwendet. Diese nimmt einen nicht-stationären Grenzflächenfilm an, welcher im Moment der Bildung die Konzentration der Flüssigphase hat. Die Penetrationstheorie kann somit wie die Zwei-Film-Theorie angenommen werden, um mit den jeweiligen Annahmen den k_{La} -Wert zu anzupassen. Dabei ist durch die Wurzelfunktion des Quotienten der Diffusionskoeffizienten bei der Penetrationstheorie der resultierende k_{La} -Wert für Butan stets größer als bei der Zwei-Film-Theorie. Im Idealfall sollten beide k_{La} -Werte bei jeweils gleichen Prozessbedingungen übereinstimmen und sich der Winkelhalbierenden annähern. So wird deutlich, dass beide Modelle in Anbetracht der einmalig durchgeführten Oxidationsversuche und dementsprechend einmalig berechneten k_{La} -Werten aus der volumetrischen Produktivität eine ausreichend genaue Abbildung ermöglichen. Im Falle der Zwei-Film-Theorie liegt der mittlere Fehler des k_{La} -Wertes bei $\pm 3,8 \text{ h}^{-1}$. Für die Betrachtung mittels Penetrations-Theorie kann der lineare Trend über den Offset von $15,9 \text{ h}^{-1}$ ggf. korrigiert werden, um eine bessere Approximation zu erreichen und es liegt ein mittlerer Fehler von $\pm 1,8 \text{ h}^{-1}$ vor (Ohne Offset-Korrektur liegt der Fehler bei $\pm 14,8 \text{ h}^{-1}$). Die Abschätzungen nach dem Oberflächenerneuerungsmodell ergaben für verschiedene Exponenten zwischen $0,6 - 0,9$ stets größere Fehler ($\pm 5,5 \text{ h}^{-1}$ bis $\pm 11,0 \text{ h}^{-1}$), weshalb diese hier nicht aufgeführt wurden (vgl. 4.1.1).

Die anderen betrachteten Prozessparameter Druck, Temperatur und Butangehalt aus Abbildung 36 hingegen, zeigten in den experimentellen Ergebnissen teils gegensätzliche Trends im Vergleich zu den verfahrenstechnischen Erwartungen. Dabei lässt sich insbesondere der Einfluss des **Butangehaltes** auf die volumetrische Produktivität bzw. den k_{La} -Wert nicht eindeutig qualitativ begründen wie der Einfluss der Begasungsrate. Zudem besteht eine Wechselwirkung zwischen Butangehalt und Druck bezüglich der volumetrischen Produktivität. Als logischen ersten Ansatz vor der experimentellen Durchführung wurde der Stofftransfer mit entsprechendem Konzentrationsgradient auch in Bezug auf den Butangehalt abgeschätzt.

Dabei lässt sich über die Henry-Gleichung für einen höheren Butanpartialdruck eine proportional höhere maximale Löslichkeit bestimmen, welche wiederum in einem proportionalen Anstieg des Stofftransportes resultiert. Auch für die Erhöhung des Systemdrucks würde sich mit einem dementsprechend höheren Partialdruck der Stofftransport entsprechend erhöhen. Für die Erhöhung des Butangehaltes ist der resultierende experimentelle Anstieg der volumetrischen Produktivität mit max. 9,8 % von 14 % auf 20 % v/v marginal (vgl. Abbildung 21 und Abbildung 22) und fällt geringer aus als der entsprechende Anstieg des Butanpartialdrucks um 42,9 % respektive der maximalen Löslichkeit. Hierbei scheint der Anstieg des Löslichkeitsgradienten durch einen Einfluss auf den $k_{L,a}$ -Wert neutralisiert zu werden. Wird der Partialdruck bei 20 % v/v Butan durch die Erhöhung des Systemdrucks von 1,1 bar auf 1,5 bar (abs.) weiter erhöht, ist der verringernde Einfluss auf den $k_{L,a}$ -Wert proportional größer als der Einfluss auf die maximale Löslichkeit respektive den Konzentrationsgradienten.

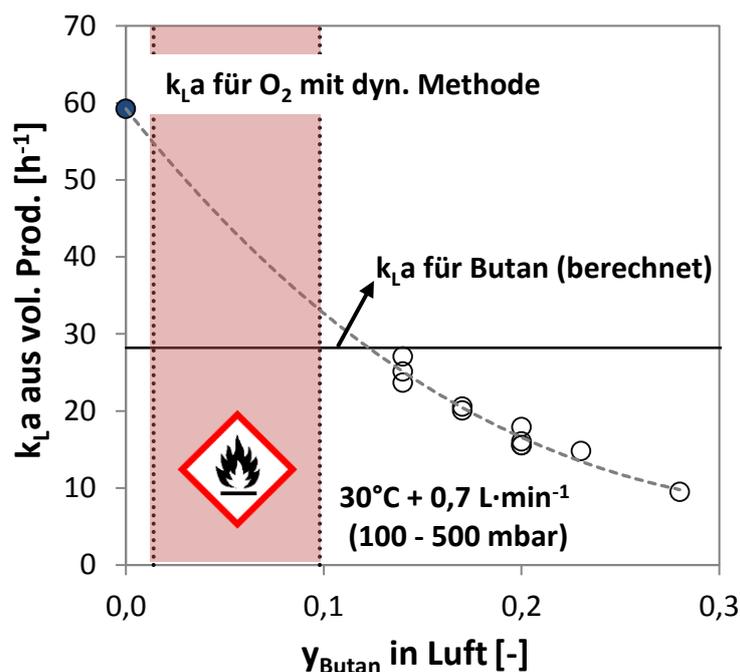


Abbildung 38 : Abhängigkeit des $k_{L,a}$ -Wertes berechnet aus der vol. Produktivität vom Butananteil; Versuche bei 30°C und bei 0,7 L·min⁻¹; 1,1 - 1,5 bar (abs.).

Als Resultat ist bei einem Druck von 500 mbar der $k_{L,a}$ -Wert mit 14 % v/v um 72 % höher als mit 20 % v/v obwohl bei 14 % v/v theoretisch ein um 30 % geringer(er) Partialdruck/Löslichkeit vorliegt. Dieses Phänomen widerspricht dabei der Vorstellung, dass ein gemessener $k_{L,a}$ -Wert mit Kenntnis der Diffusionskoeffizienten direkt auf ein anderes Gas übertragbar ist. So würde bei Messung des $k_{L,a}$ -Wertes mit Luftsauerstoff bei definierten Prozessbedingungen

(Begasungsrate, Temperatur, Druck, Medium), eine Umrechnung hin zum k_{La} -Wert für ein weiteres Gas möglich sein.

Sollte sich für dieses Gas nun der Gasanteil/Partialdruck ändern, würde dieses in die Transferrate über die sich ändernde maximale Löslichkeit C^* einfließen. Dabei ist die Annahme, dass der k_{La} -Wert für alle Butananteile y_{Bu} bei konstantem Systemdruck auch konstant bleibt. Aus der volumetrischen Produktivität, welche für verschiedene Butangehalte gemessen worden ist, kann durch die Kenntnis der maximalen Löslichkeit, ein anscheinender k_{La} -Wert berechnet werden. Der zeitliche Anstieg der Buttersäurekonzentration setzt entsprechend voraus, dass in mindestens gleichem Maße auch Butan ins Medium transferiert worden sein muss. Dieser so berechnete k_{La} -Wert ist somit als minimaler k_{La} -Wert zu verstehen und lässt sich für die Versuche mit unterschiedlichen Butangehalten in Abbildung 38 auftragen. Dabei ist auch der mit Luftsauerstoff gemessene k_{La} -Wert (blauer Kreis) eingetragen, auf dessen Basis mit den Diffusionskoeffizienten der Butananteil-unabhängige k_{La} -Wert für Butan (schwarze horizontale Linie) abgeschätzt werden kann. Dabei wird deutlich, dass mit zunehmenden Butananteil der k_{La} -Wert, berechnet aus der vol. Produktivität, nicht konstant bleibt, sondern sinkt.

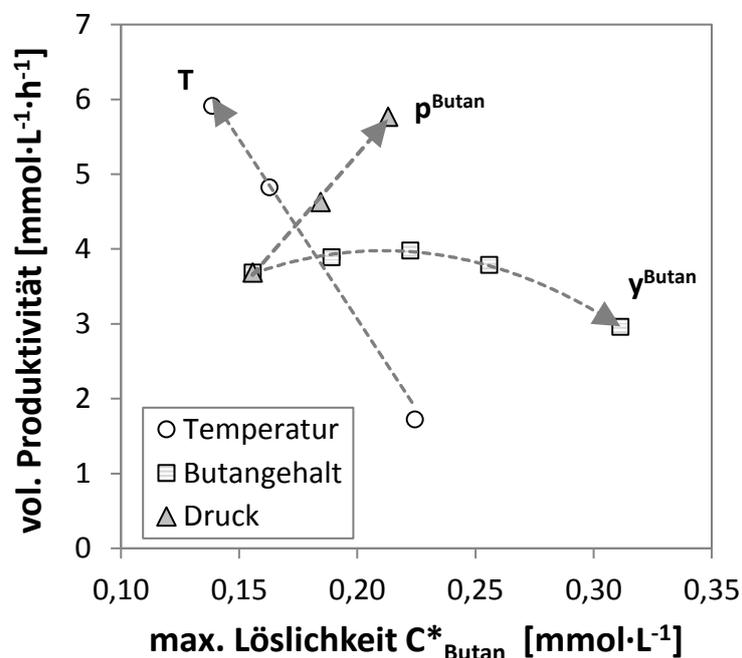


Abbildung 39 : Volumetrische Produktivität in Abhängigkeit der maximalen Löslichkeit von Butan bei verschiedenen Versuchsreihen; Der jeweils variierte Prozessparameter ist angegeben; Temperatur 25 °C – 40 °C; Druck 100 mbar – 500 mbar; Butangehalt 14 % v/v – 20 % v/v; 0,7 L·min⁻¹ Begasungsrate.

Während für die Versuche mit 14 % v/v der k_{La} -Wert vom mit der Zwei-Film-Theorie berechneten k_{La} -Wert im Mittel über alle Druckstufen mit $-2,9 \pm 1,4 \text{ h}^{-1}$ nur geringfügig

abweicht, ist die Abweichung bei 20 % v/v ($-11,9 \pm 1,0 \text{ h}^{-1}$) deutlich signifikanter. Bei 28 % v/v ist diese Abweichung mit $18,7 \text{ h}^{-1}$ noch größer. Hier zeigt sich kein konstantes Verhalten des k_{La} -Wertes über den Gasanteil, wobei in weiteren Versuchen dieses Verhalten weiter validiert werden sollte. Hier wäre eine Messung der Blasengrößenverteilung bei verschiedenen Butangehalten denkbar, um einen entsprechenden Einfluss zu validieren. Auch eine adäquate Erklärung des Phänomens sollte angestrebt werden. Dennoch reichen die sich ergebenden Trends aus, um eine Abschätzung der Abhängigkeit des k_{La} -Wertes bzgl. des Butananteils zu ermöglichen. Mit dieser kann dann als Teileinfluss (Formel E12 in Kapitel 6.6) die Gesamtabhängigkeit bzgl. aller Prozessparameter kombiniert werden.

Die Versuchsreihen zu den Prozessparametern Temperatur, Druck und Butangehalt ändern die maximale Löslichkeit von Butan im Medium, wobei die resultierenden Trends der volumetrischen Produktivität keinen direkten Zusammenhang in Abbildung 39 zeigen. Gegenüber dem Trend bei Druckzunahme bzw. Butangehaltserhöhung steigt die volumetrische Produktivität mit sinkender maximaler Löslichkeit von Butan im Medium, wenn dieses aus der Erhöhung der **Temperatur** resultiert. Dabei ist die Zunahme an volumetrischer Produktivität von 30 °C auf 40 °C um 44 % nicht allein über die damit einhergehende Erhöhung des Diffusionskoeffizienten (+24 %) zu begründen.

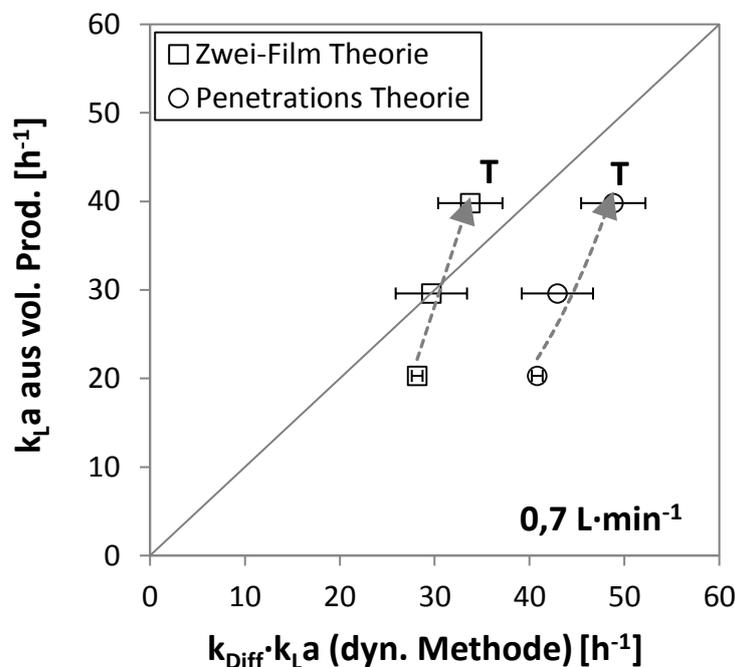


Abbildung 40 : Abhängigkeit des k_{La} -Wertes aus vol. Produktivität vom k_{La} -Wert gemessen mit der dynamischen Methode und skaliert über Zwei-Film- und Penetrations-Theorie; $0,7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; $1,1 \text{ bar}$ (abs.) bei 30°C , 35°C und 40°C wobei die Temperaturerhöhung durch die Pfeilrichtung der Trendlinie aufgezeigt ist.

Der Anstieg der vol. Produktivität mit der Temperatur lässt sich durch die einhergehende Erhöhung des k_{La} -Wertes in Abbildung 40 aufzeigen. Dabei wird deutlich, dass die Übertragungsfehler mit der Zwei-Film-Theorie geringer sind als bei der Betrachtung mittels Penetrations-Theorie. Dieser liegt im Mittel bei $\pm 4,7 \text{ h}^{-1}$ und zeigt, dass hier eine ausreichende Abschätzung des k_{La} -Wertes für Butan bzw. der sich daraus ergebenden volumetrischen Produktivität aus dem mit Luftsauerstoff gemessenen k_{La} -Wertes durchgeführt werden kann. Die volumetrische Produktivität bei 35 °C und 40 °C wurden jeweils nur einfach bestimmt. Dennoch zeigt sich aus dem linearen Trend der Ausbeute (vgl. Abbildung 26) und entsprechend dem daraus berechneten linearen Trend des k_{La} -Wertes (Abbildung 41) mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,998$, dass dieser eine hohe Gültigkeit besitzen sollte. Zudem ist der relative Fehler bei Reproduktion bei $T_{ref} = 30 \text{ °C}$ mit $1,3 \%$ gering genug, um hier von einer qualitativen und quantitativen Richtigkeit auszugehen. So zeigen die Daten aus der fermentativen Oxidation bzgl. der Temperaturabhängigkeit eine gute Reproduzierbarkeit und einen eindeutigen Trend, der mit den k_{La} -Versuchen mit Luftsauerstoff bestätigt werden kann.

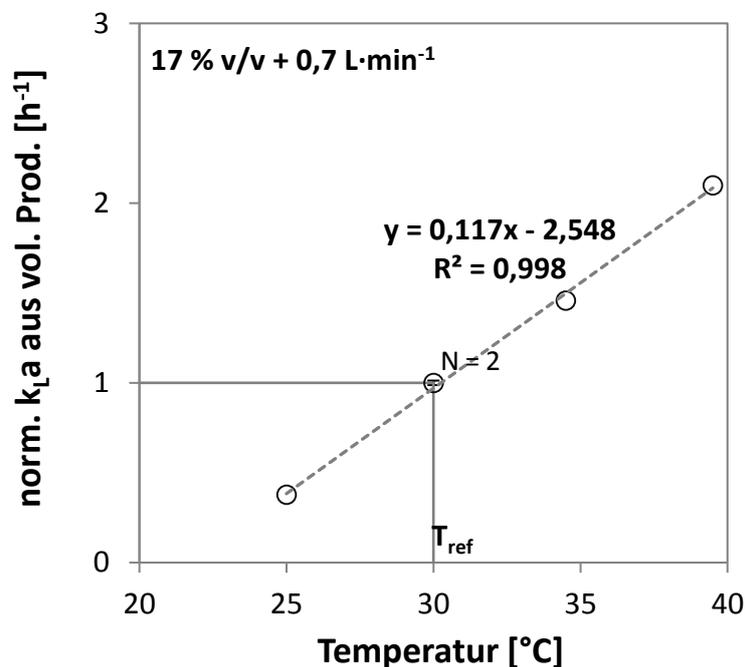


Abbildung 41 : Abhängigkeit des auf den bei $T_{ref} = 30 \text{ °C}$ normalisierten k_{La} -Wert von der Temperatur; Begasungsrate von $0,7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ mit 17% v/v bei $1,1 \text{ bar}$ (abs.); k_{La} bei $30 \text{ °C} = 20,3 \text{ h}^{-1}$.

Hier könnte in Zukunft interessant werden, inwieweit dieser auf dem Stofftransport beruhende Trend auch bei langen Fermentationsdauern von der biologischen Seite her komplettiert werden kann. Die bisherigen Versuche dauerten maximal 10 Stunden und so

bleibt zu klären, ob bei für den Stofftransport begünstigenden, erhöhten Temperaturen eine entsprechende Zellstabilität vorliegt.

Nach der übergreifenden Betrachtung des Prozessparameters Temperatur, soll im nächsten Abschnitt der **Systemdruck** analog diskutiert werden. Der Einfluss des Systemdrucks auf die volumetrische Produktivität (vgl. 6.3.4) zeigt, dass diese im Fall von 14 % v/v überproportional mit steigendem Druck zunimmt. Im Falle von 20 % v/v Butan steigt die vol. Produktivität dagegen unterproportional mit steigendem Systemdruck auf 1500 mbar (abs.). Der Konzentrationsgradient als Triebkraft für den Stofftransport begründet somit teilweise den beobachteten Trend. Hier ist eine Überlagerung des Einflusses von Systemdruck und Butananteil gegeben. Die Versuche sind vergleichend bzgl. der sich aus der vol. Produktivität ergebenden k_{La} -Werte und der mit der dynamischen Methode gemessenen k_{La} -Werte in Abbildung 42 gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass der k_{La} -Wert aus der dynamischen Messmethode nach Umrechnung auf Butan mit dem Druckanstieg mit einer relativen Abweichung von 1,6 % nahezu konstant bleibt (Mittelwert $28,5 \text{ h}^{-1} \pm 0,45 \text{ h}^{-1}$). Zudem ist zu erkennen, dass bei erhöhtem Druck die relative Standardabweichung von 0,9 % auf bis zu 3,8 % deutlich zunimmt. Dieses Verhalten kann durch die manuelle Druckeinstellung erklärt werden, da bei der dynamischen Methode nach der Begasung mit Stickstoff und dem Wechsel auf Luft händisch an einem Nadelventil der Systemdruck nachkorrigiert werden muss. Hier ließen sich in Zukunft mit elektronischen Druckreglern geringere Abweichungen erreichen. Auch hier kann der Einfluss des Systemdrucks auf den k_{La} -Wert bzgl. Butan, nicht direkt gemessen werden, da keine adäquate Sonde zur Messung der Gelöstkonzentration von Butan zur Verfügung steht. Dabei lässt sich wie schon für die anderen Prozessparameter der k_{La} -Wert aus der vol. Produktivität über den mit Luftsauerstoff gemessenen k_{La} -Wert abschätzen. Für die Betrachtung des Einflusses des Systemdrucks (mit geringstem Butangehalt von 14 % v/v) ergeben die Messungen des k_{La} -Wertes mit der dynamischen Methode eine gute Übertragbarkeit in Abbildung 42. Der mittlere Fehler für den k_{La} -Wert liegt hier bei $\pm 3 \text{ h}^{-1}$ bei der Anwendung der Zwei-Film-Theorie für die Einberechnung der Diffusionskoeffizienten. Dabei wird deutlich, dass sich der k_{La} -Wert (dyn. Methode) im Bereich von 1,1 bar bis 1,5 bar nur geringfügig ändert. Werden die aus der volumetrischen Produktivität berechneten k_{La} -Werte für die Versuche mit 20 % v/v und 500 mbar (abs.) den mit der dynamischen Methode gemessenen Werte gegenübergestellt, fällt der Übertragungsfehler mit $> 10 \text{ h}^{-1}$ deutlich höher aus als bei den Versuchen mit 14 % v/v. Wird dabei der verringerte Einfluss der

Butankonzentration auf den k_{La} -wert als Skalierungsfunktion (vgl. 6.3.2 in diesem Fall liegt der Faktor bei 0,75) miteinbezogen, kann der mit der dynamischen Methode gemessene k_{La} -Wert entsprechend korrigiert werden.

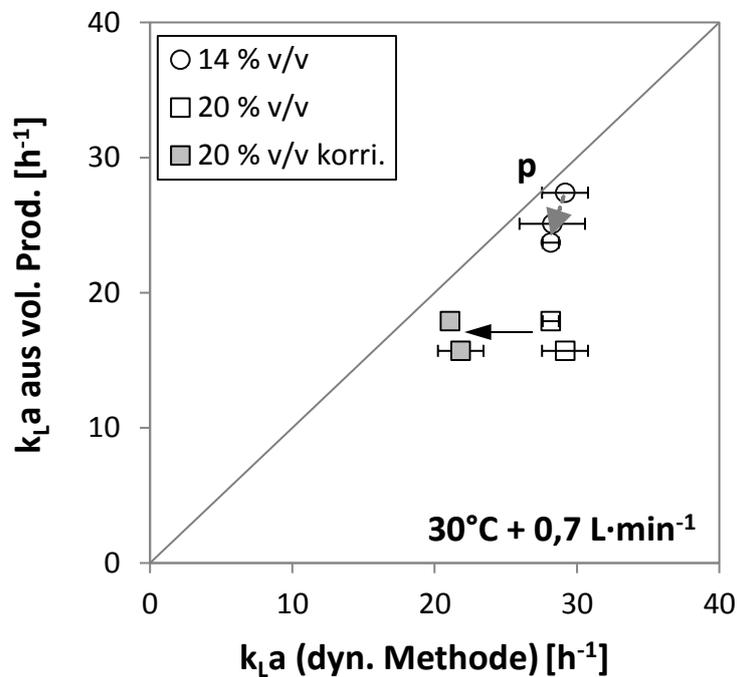


Abbildung 42 : Gegenüberstellung des aus der vol. Produktivität berechneten k_{La} -Wertes und des k_{La} -Wertes aus der dyn. Messung; 30°C und 0,7 L·min⁻¹; Korrektur des mittels dynamischer Methode gemessenen k_{La} -Wertes über eine Korrektur bzgl. des Butangehaltes von 20 % v/v nach Abbildung 24.

Dieses wurde in Abbildung 42 durchgeführt (graue Quader) und zeigt, dass mit der vorgeschlagenen Korrektur die Übertragbarkeit relativ um 53 % auf 4,7 h⁻¹ verbessert wird im Gegensatz zur Übertragung ohne Korrektur. Um die Einflüsse der Prozessparameter auf den k_{La} -Wert quantitativ gegenüberzustellen, wurden diese normalisiert aufgetragen. Dazu wurde die Änderung des k_{La} -Wertes mit dem k_{La} -Wert der Standardbedingungen für jede Versuchsreihe der Prozessparameter in Abbildung 43 normalisiert. Als Standardbedingungen mit einem k_{La} -Wert von 23,7 h⁻¹ wurde eine Temperatur von 30 °C mit einer Begasungsrate von 0,7 L·min⁻¹ bei 1,1 bar und mit 14 % v/v gewählt, da diese Parameterauswahl in allen Versuchsreihen vertreten ist (Nulllinie im Diagramm). So ändert sich der k_{La} -Wert bei Erhöhung der Temperatur von 30°C auf 40°C von 20,3 h⁻¹ auf 42,7 h⁻¹. Dieses entspricht einer Zunahme des k_{La} -Wertes von 110 % wie im positiven Bereich des Temperatur-Balkens zu erkennen. Durch die Verringerung der Temperatur von 30 °C auf 25 °C nimmt der k_{La} -Wert von 20,3 h⁻¹ um 62 % auf 7,7 h⁻¹ ab, wie dem Negativbereich des Temperatur-Balkens zu entnehmen. So wurde für jeden Prozessparameter der Einfluss auf den k_{La} -Wert analog normiert. Betrachtet man die Abhängigkeit des k_{La} -Wertes (aus vol. Prod.) von den

Prozessparametern kombiniert in Abbildung 43 wird deutlich, dass bei Druckerhöhung der Einfluss auf den k_{La} -Wert vergleichsweise gering ausfällt.

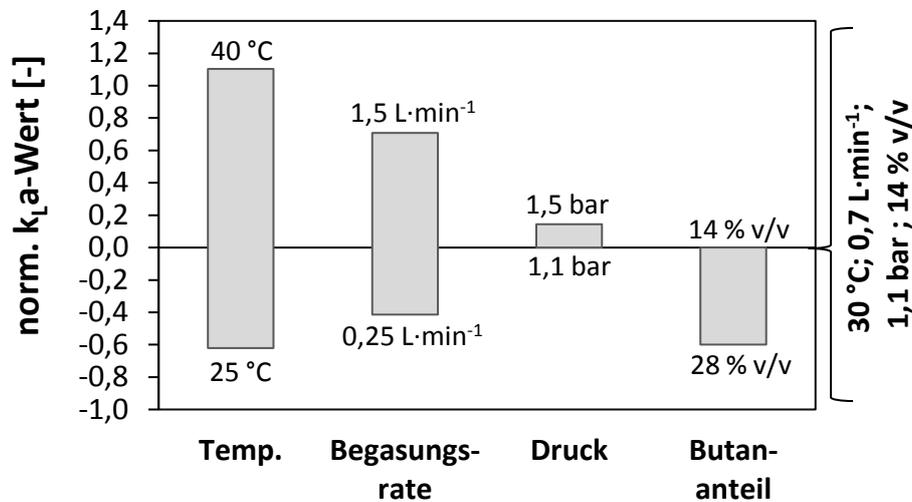


Abbildung 43 : normalisierter Einfluss der einzelnen Prozessparameter auf den k_{La} -Wert; bezogen auf die Standardbedingungen von 0,7 L·min⁻¹ bei 30 °C mit 14 % v/v Butane bei 1,1 bar.

Deshalb sollte bei einer k_{La} -basierten Übertragung die Betrachtung der Parameter Temperatur und Butangehalt einbezogen werden. Die Abhängigkeit des k_{La} -Wertes von der Begasungsrate ist signifikant, hängt jedoch deutlich von Reaktortyp, Reaktordimensionen und Begasungsadapter ab, weshalb eine entsprechende Analyse im zu übertragenden Reaktor vorher unabdingbar ist. Genauso verhält es sich mit dem reaktorspezifischen Verhalten des k_{La} -Wertes bei Temperaturveränderung. Für eine Übertragung in andere Reaktorkonzepte bzw. zur Skalierung lässt sich nun mit dem reaktorspezifischen k_{La} -Wert am besten bei der Reaktionssolltemperatur T [K] und einer definierten Begasungsrate über den Quotienten der Zwei-Film-Theorie $\frac{D_{Bu}}{D_{O_2}}$ [-] der k_{La} für Butan bestimmen. Mit diesem kann nun anhand des Trends des Butangehaltes y_{Bu} in mol·mol⁻¹ der modifizierte k_{La} -Wert und mit diesem die volumetrische Produktivität und die gekoppelte Ausbeute abgeschätzt werden. Sollte ein ähnliches Strömungsregime wie in der verwendeten Laborblasensäule vorliegen kann der Temperatureinfluss über den ermittelten Trend grob abgeschätzt werden, falls ein k_{La} -Wert nicht für die Reaktionssolltemperatur vorliegt. Dazu wurden zwei skalierenden Terme in Anhängigkeit der Temperatur $A_{f(T)}$ [-] und des Butangehaltes $B_{f(y_{Bu})}$ [-] in Gleichung E11 und E12 hinzugefügt. Die dazugehörigen Trends sind in Abbildung 38 und Abbildung 41 gezeigt. Nachfolgend ist dieser Ansatz formuliert, um die volumetrische Produktivität/ Butantransfertrate in Abhängigkeit der Prozessparameter Temperatur (vgl. Abbildung 27) und

Butangehalt (vgl. Abbildung 24) weiter zu skalieren. Dabei wirken sich die Prozessparameter teilweise auf den k_{La} -Wert k_{La} [h^{-1}] direkt jedoch alle durch Partialdruck (y_{Bu} [-] und p [bar]) und die Temperatur T [K] über die Henry-Konstante für Butan in Wasser H_{Bu}^{cp} [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$] und den Temperaturabhängigkeitskoeffizienten C [K] (vgl. 4.1.1) auf die maximale Löslichkeit und damit auf den Konzentrationsgradienten aus. Zusammengefasst ergibt sich so für die Butantransfertrate in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ folgender Ausdruck in Gleichung E11. Dabei wird hier davon ausgegangen, dass die Butanaufnahmerate der Zellen größer ist als der Butaneintrag und so die Konzentration an gelöstem Butan im Medium nahe Null liegt, wobei der Konzentrationsgradient somit nur von der maximalen Löslichkeit abhängt.

$$BTR = A_{f(T)} \cdot B_{f(y_{Bu})} \cdot k_{La}(30^\circ\text{C}) \cdot \frac{D_{Bu}}{D_{O_2}} \cdot p \cdot H_{Bu}^{cp} \cdot y_{Bu} \cdot \text{EXP} \left(C \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{303,15} \right) \right) \quad [\text{E11}]$$

$$\text{mit } A_{f(T)}[-] = 1 + [T_i - 30^\circ\text{C}] \cdot 0,117^\circ\text{C}^{-1} \quad [\text{E12}]$$

$$\text{und } B_{f(y_{Bu})}[-] = 1 + [0,14 - y_{Bu}] \cdot -4,189 \quad [\text{E13}]$$

Um eine Übertragbarkeit zu untersuchen, wurden fermentativen Oxidationen im Rührkesselreaktor, welcher auch für die Hochzelldichte-fermentationen verwendet wurde, mit 2 L Medium durchgeführt (vgl. 5.3.1). Dabei wurde zuvor der k_{La} -Wert bei 30°C mit 186 h^{-1} und bei 35°C mit 221 h^{-1} mittels dynamischer Messmethode bei einer Begasungsrate von $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bestimmt. Diese Steigerung des k_{La} -Wertes von 19 % ist deutlich geringer als die Steigerung von ca. 54,7 % bei der gleichen Temperaturerhöhung aus dem Trend der Blasensäule nach Abbildung 41. Dieses zeigt deutlich, dass die Temperaturabhängigkeit des k_{La} -Wertes reaktorspezifisch bestimmt werden sollte. Zu der k_{La} -Messung im Rührkesselreaktor bei 35°C und mit $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde ein entsprechender Oxidationsversuch mit 14 % v/v Butangehalt durchgeführt. Dieser wurde wie die k_{La} -Messung ohne Überdruck durchgeführt, da der Rührkesselreaktor mit Flachboden aus Glas nicht mit Überdruck betrieben werden kann. Die resultierende volumetrische Produktivität lag bei $11,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ was ca. $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ entspricht und um 11 % von der über Gleichung E11 (Ohne die beiden Adaptionsterme) berechneten Butantransfertrate von $12,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ für diese Prozessparametereinstellungen abweicht. Der sich so aus der volumetrischen Produktivität ergebene k_{La} -Wert bzgl. Butan liegt für den Versuch mit 14 % v/v bei 35°C und $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei Atmosphärendruck bei $94,7 \text{ h}^{-1}$. Die entsprechenden Vergleiche von

Blasensäule und Rührkessel bzgl. des Einflusses von Temperatur und Butangehalt auf den k_{La} -Wert sind in Abbildung 44 dargestellt.

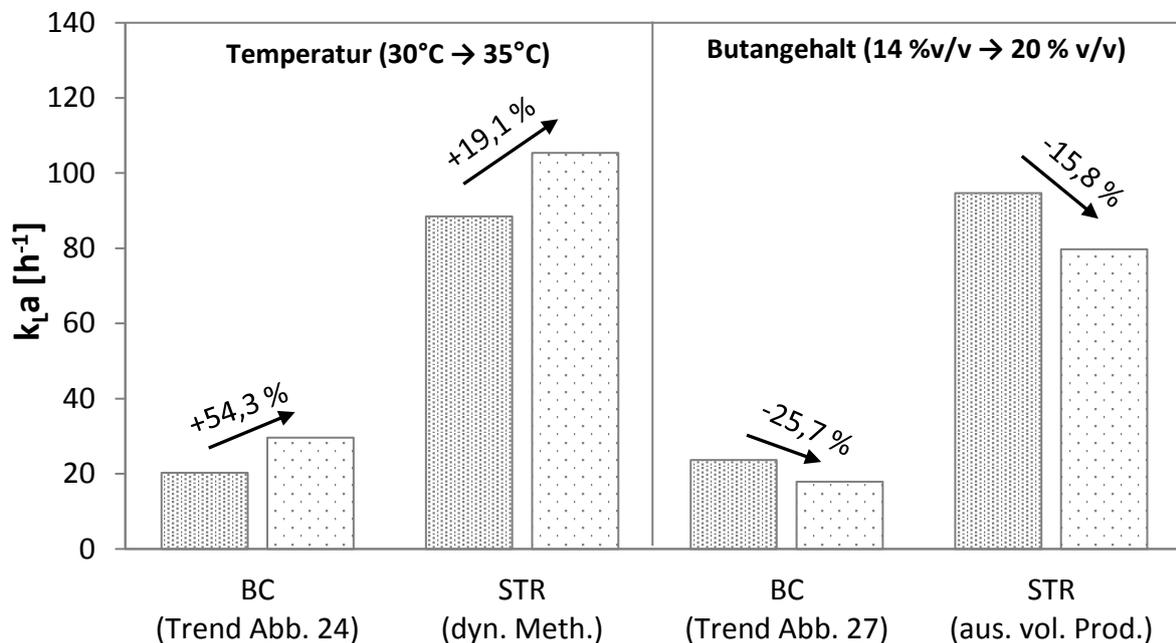


Abbildung 44 : Vergleich des Einflusses von Temperatur und Butangehalt auf den k_{La} -Wert in Blasensäule und Rührkessel anhand der Trends aus der Charakterisierung; Oxidationsversuche im Rührkesselreaktor mit $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 35°C und Atmosphärendruck, Messung des k_{La} im Rührkessel mit dynamischer Methode und optischer Messung bei $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Luft und Atmosphärendruck.

Für andere Reaktorkonzepte, besonders mit erzwungener Konvektion wie durch Rührer-Einbauten im Rührkesselreaktor, ist der Trend des k_{La} -Wertes bei Temperaturerhöhung nicht dem in der Blasensäule gleichzusetzten. Hier sollte auf den $A_{f(T)}$ Term verzichtet werden bei den Berechnungen der Butantransferrate. Die Butantransferrate ist der volumetrischen Produktivität gleichzusetzten, insofern die Butanaufnahme durch die Zellen größer ist und so jedes eingetragene Butanmolekül umgesetzt wird. Für diese Berechnungsvorschrift kann zudem eine Fehlerabschätzung durchgeführt werden. Dazu muss zwischen den k_{La} -Trends auf Basis der vol. Produktivität und den k_{La} -Trends gemessen über die dynamische Methode mit Luftsauerstoff unterschieden werden. Der Fehler bzgl. den k_{La} -Trends aus der vol. Produktivität ist mit Regressionskoeffizienten von $R^2 > 0,99$ deutlich geringer als die Übertragung mittels k_{La} -Wert auf Basis der dynamischen Methode. Innerhalb der Versuchsreihen in der Blasensäule wurden zudem Mehrfahrbestimmungen durchgeführt, wobei der auf Basis der volumetrischen Produktivität berechnete k_{La} -Wert einen relativen Fehler von 1,3 % (N = 2) bis 1,5 % (N = 3) aufweist. Der größte Fehler entsteht somit bei der Übertragung des reaktorspezifischen k_{La} -Wertes gemessen mit der dynamischen Methode hin

zum k_{La} -Wert bzgl. Butan und dann verglichen mit dem k_{La} -Wert aus der volumetrischen Produktivität. Hier wurden Übertragungsfehler von durchschnittlich $\pm 3,8 \text{ h}^{-1}$ bis maximal $5,9 \text{ h}^{-1}$ verzeichnet, was bei der Übertragung der Begasungsrate einem relativen Fehler von 18,7 % (vgl. Abbildung 37) entspricht. Der relative Fehler von 11 % zwischen dem mittels dynamischer Methode gemessenen k_{La} -Wert und dem k_{La} -Wert aus der volumetrischen Produktivität für den Oxidationsversuch im Rührkesselreaktor liegt somit unter der maximalen Abweichung, welche sich bei den Versuchen in der Blasensäule ergab. Um den Einfluss des Butangehaltes auf den k_{La} -Wert bei der Übertragung in den Rührkessel zu betrachten wurde ein Oxidationsversuch mit 20 % v/v Butan bei 35°C und $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate bei Atmosphärendruck durchgeführt. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Versuch mit 14 % v/v eine Zunahme der volumetrischen Produktivität von 20,3 % auf $13,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Der hiermit berechnete k_{La} -Wert nimmt dabei um 15,8 % auf $79,7 \text{ h}^{-1}$ ab. Im Vergleich dazu nimmt der k_{La} Wert bei den Blasensäulenversuchen mit $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 30°C und 1,1 bar bei der Erhöhung des Butangehaltes von 14 % v/v auf 20 % v/v um 24,4 % ab. Bei den Blasensäulenversuchen mit $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 30°C und 1,1 bar nimmt der k_{La} -Wert bei der gleichen Erhöhung des Butangehaltes um 26,4 % ab und im umfassenden Trend der Charakterisierung um -25,7 %. (vgl. Abbildung 44). Daraus wird deutlich, dass eine Übertragung des quantitativen Butaneinflusses auf den k_{La} -Wert kaum in andere Reaktoren möglich ist. Qualitativ bestätigen dabei die Versuche im Rührkessel, dass eine Erhöhung des Butangehaltes nicht in der Erhöhung der volumetrischen Produktivität resultieren, die aufgrund des höheren Partialdruckes von Butan zu erwarten wäre.

6.6.2 Priorisierung der Prozessparameter

Auf Basis der Ergebnisse der Charakterisierung kann zudem eine **Priorisierung der Prozessparameter** getroffen werden. In Abbildung 45 sind die normierten Einflüsse der einzelnen Prozessparameter auf die volumetrische Produktivität und die Ausbeute verglichen. Dazu wurde wie in Abbildung 43 für den k_{La} -Wert der jeweilige Einfluss der Prozessparameter mit dem Wert unter Standardbedingungen normiert. Die **Standardbedingungen** sind mit **$0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 1,1 bar und 30°C mit 14 % v/v Butan** dieselben und stellen die Nulllinien in Abbildung 45 mit einer volumetrischen Produktivität von $3,69 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einer Ausbeute von 2,59 % dar. Dabei wird deutlich, dass die Begasungsrate den höchsten Einfluss (+78 %) auf die vol. Produktivität hat, diese also bei einer Übertragung/Skalierung der höchsten Priorität zugeordnet werden sollte. Dem entgegengesetzt nimmt die Ausbeute von $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$

(Standardbedingungen) nur marginal (-14 %) bis $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ab. Hier überwiegt die deutliche Steigerung der Produktivität dem geringen Verlust der Ausbeute. Dabei ist das Verhalten des k_{La} -Wertes/vol. Produktivität von der Begasungsrate stark reaktorabhängig. Hier spielen Reaktortyp, -dimensionen und Einbauten eine entscheidende Rolle. Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktoren sind auf Grund des geringen Innendurchmessers und damit verbundenen Wandeffecten nur bedingt skalierbar und bzgl. der Begasungsrate/Leerrohrgeschwindigkeit nur bedingt geeignet.

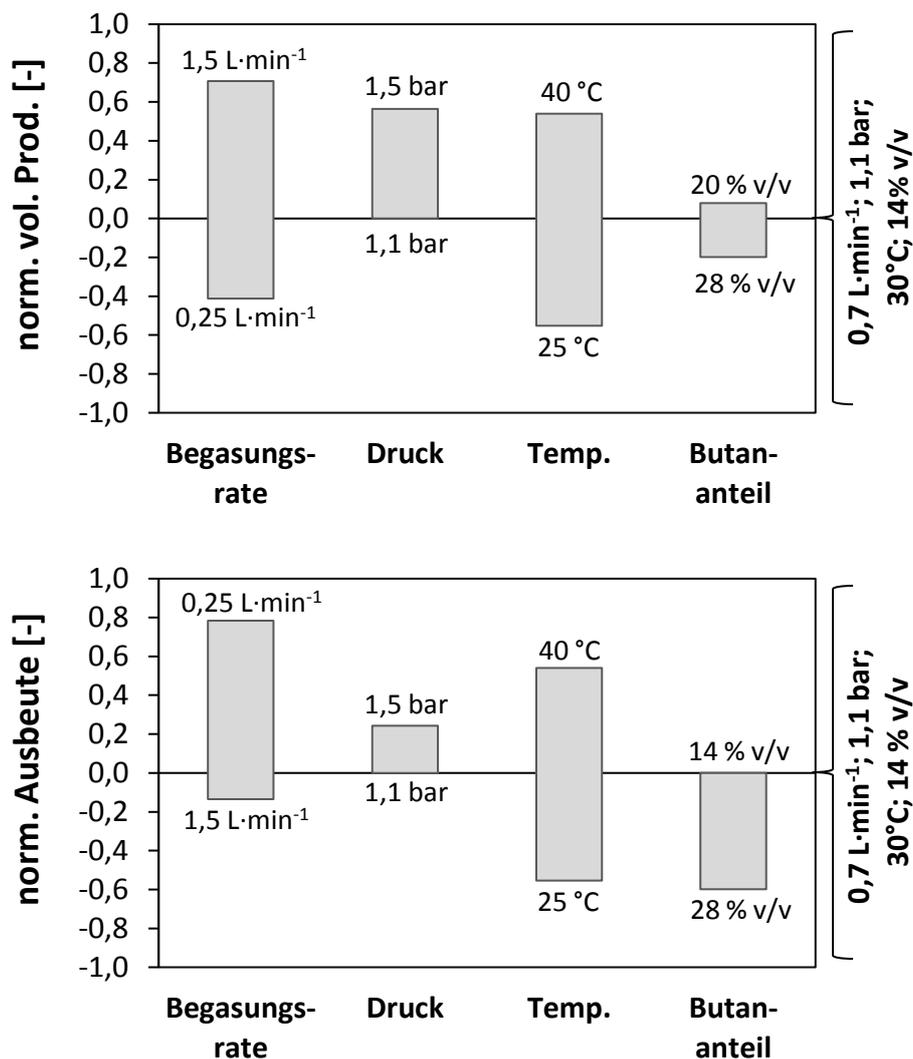


Abbildung 45 : Einfluss (normalisiert) der Prozessparameter auf die volumetrische Produktivität und die Ausbeute; jeweils mit Minimal- und Maximalwerten für die Prozessparameter auf Basis der rechts spezifizierten Standardwerte für die Prozessparameter;

Hier bedarf es bei einer Übertragung zuerst einer Charakterisierung des Reaktors bzgl. des Einflusses der Leerrohrgeschwindigkeit auf den k_{La} -Wert. Nach der Begasungsrate hat der Druck den höchsten Einfluss (+56 %) auf die vol. Produktivität. Dabei sind die Standardbedingungen bei Minimaldruck durchgeführt worden und eine Druckzunahme wirkt

sich über die Erhöhung der Löslichkeit und dem damit direkt verbundenen Konzentrationsgradienten direkt auf die Produktivität aus. Auch die Ausbeute nimmt mit steigendem Druck leicht (+24 %) zu. Die Temperatur sollte generell hochgehalten werden, da bei 40 °C sowohl bei vol. Produktivität (+54 %) als auch bei der Ausbeute (54 %) das Optimum erreicht wird. Eine weitere Erhöhung der Temperatur sollte bzgl. des k_{La} -Wertes den Stofftransport ins Medium weiter erhöhen, jedoch ist beim Einsatz von Mikroorganismen insbesondere *E. coli* die Spannbreite der Temperatur zwischen 30 °C und 40 °C optimal. Eine weitere Temperaturerhöhung würde sehr wahrscheinlich zum Verlust der Zellaktivität führen. Der Butangehalt beeinflusst die volumetrische Produktivität im Vergleich zum Einfluss der anderen Prozessparameter nur marginal (+8 % bis – 20 %) und verringert bei hohen Anteilen die Ausbeute deutlich (-60 %). Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, wobei dieser bei einer Skalierung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dieses ist unerwartet, da dieser Prozessparameter vom klassischen Verständnis her, deutliche Produktivitätssteigerungen ermöglichen sollte. Durch eine Erhöhung des Butangehaltes erhöhen sich im gleichen Maße dessen Partialdruck und damit auch die maximale Löslichkeit des Butans im Medium. Der sich dabei im gleichen Maße vergrößernde Konzentrationsgradient als Triebkraft für den Stofftransport sollte eine entsprechende Steigerung der volumetrischen Produktivität begünstigen. So wäre es verfahrenstechnisch möglich mit 28 % v/v statt 14 % v/v Butangehalt zu begasen und theoretisch die volumetrische Produktivität dabei analog zum Konzentrationsgradienten um 100 % zu erhöhen. Dabei sollte die Erhöhung des Partialdruckes bei jeder Versuchsparemetereinstellung entsprechend die Produktivität erhöhen, wenn man die klassische Transferraten-Kalkulation zu Grunde legt.

6.6.3 Skalierungsabschätzung

Mit den entsprechenden Berechnungsformeln der volumetrischen Produktivität sowie der Abschätzung aus den 5 L Blasensäulenversuchen lässt sich eine Abschätzung im Falle einer **Skalierung** durchführen. Dabei ist aufgrund der Wandeffekte bei 80 mm Innendurchmesser eine adäquate Quantifizierung nur eingeschränkt möglich. Dennoch soll im Folgenden das Beispiel einer Blasensäule mit 20 Meter Höhe und 80 mm Durchmesser abgeschätzt werden. Die volumetrische Produktivität lässt sich dabei als Funktion von Begasungsrate, Druck, Temperatur und Butangehalt formulieren. Dabei sind sowohl der Druck als auch die Begasungsrate spezifisch für ein entsprechendes Volumenelement je nach Höhenposition in der Blasensäule. In 20 Meter Tiefe bzw. am Boden der Blasensäule ist der Umgebungsdruck

damit 3 bar absolut. Davon entfallen 1 bar auf den Atmosphärendruck am Kopf der Säule und 2 bar auf den Flüssigkeitsdruck aufgrund der 20 Meter Flüssigkeitssäule (Medium nahezu dichteäquivalent zu Wasser). Am Boden der Blasensäule wird die Begasungsrate festgelegt, wobei die Gasdichte dem Umgebungsdruck (3 bar) angepasst ist. Beim Aufsteigen der Blasen in der Blasensäule wird aufgrund des Stoffüberganges ins Medium die Blase kleiner, wogegen sie durch den geringeren Druck expandiert und größer wird. Dabei ist die Druckreduzierung deutlich signifikanter als der partielle Stoffübergang ins Medium, weshalb die Blasen beim Aufsteigen in der Blasensäule größer werden. Werden am Boden der Kolonne nun $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 3 bar (abs.) begast und es findet kein Stoffaustausch mit dem Medium statt, würde auf 10 Meter Höhe der 20 Meter Blasensäule eine Begasungsrate von $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 2 bar (abs.) vorliegen. Nach diesem Beispiel können nun für jeden Höhenmeter der Blasensäule die entsprechend vorliegenden Prozessparameter bestimmt werden. Damit lassen sich dann höhen spezifische volumetrische Produktivitäten bestimmen und entsprechende Ausbeuten berechnen und für die gesamte Blasensäule aufsummieren. Die Tabelle A24 im Anhang zeigt dabei ein Rechenbeispiel für eine 20 Meter hohe Blasensäule mit einer Begasungsrate von $0,7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ und 14 v/v Butan bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Um die Verringerung der volumetrischen Produktivität aufgrund des verschiedenen Strömungsbildes zu berücksichtigen (siehe 6.5), wurde ein Korrekturfaktor von 0,7 (-30 % als konservative Schätzung aus Abbildung 35) angenommen.

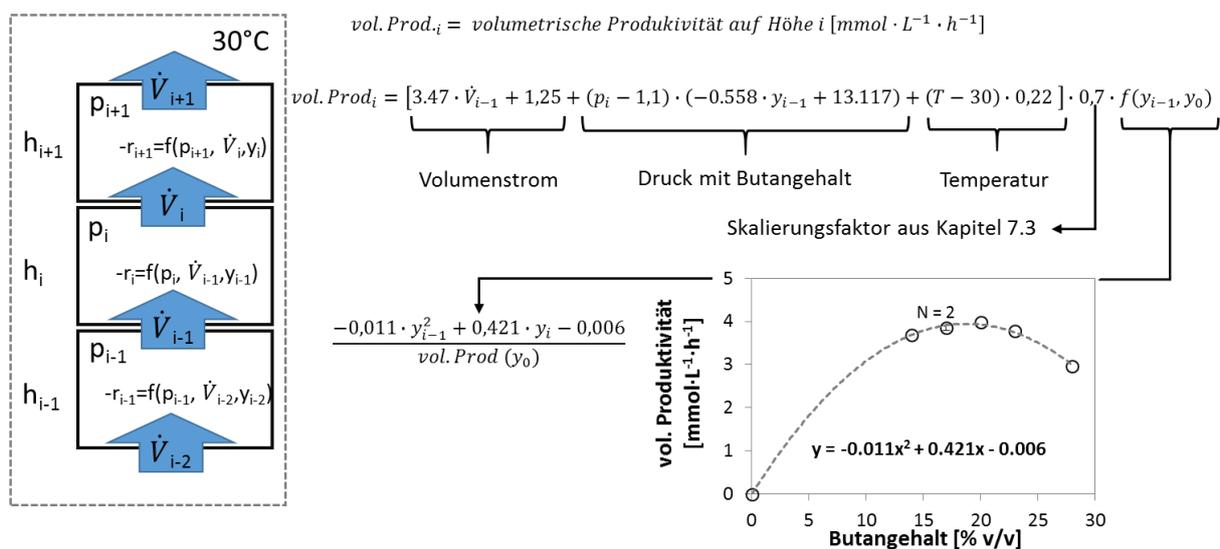


Abbildung 46 : Berechnungsschema für die Approximierung der volumetrischen Produktivität innerhalb eines Höhenelementes der Blasensäule in Abhängigkeit der relevanten Prozessparameter Begasungsrate; Druck $p=f(h)$, Temperatur T , und Butangehalt y ; Genaue Berechnung im Anhang A24

Da die Laborversuche in einer Blasensäule mit 80 mm Innendurchmesser durchgeführt wurden, wurde aufgrund der Wandeffekte auch bei der Skalierungsrechnung ein

Innendurchmesser von 80 mm beibehalten. Damit ergibt sich für die 20 Meter Blasensäule ein Volumen von 100 L. Die Skalierung mit konstantem Innendurchmesser ist dabei für eine industrielle Anwendung irrelevant, erlaubt aber aufgrund der herrschenden Wandeffekte und den dabei übertragbaren Leerrohrgeschwindigkeiten eine vertretbare Annahme im Rahmen dieser groben Abschätzung. Weiter ist eine definitiv auftretende Koaleszenz der Gasblasen über die Blasensäulenhöhe und damit einhergehende Verringerung des Stofftransportes nicht berücksichtigt. Auch ist der Einfluss der Expansion der Gasblasen beim Aufstieg in der Blasensäule und eine daran gekoppelte Änderung der spezifischen Oberfläche und der Aufstiegsgeschwindigkeit nicht einbezogen worden. Hier bedarf es einer weiteren Betrachtung, um diese Effekte in die Berechnungsvorschrift einzubeziehen. Dennoch verringern die hier vernachlässigten Effekte tendenziell den k_{La} -Wert bzw. die volumetrische Produktivität, weshalb diese Abschätzung als optimistisch maximierend betrachtet werden kann.

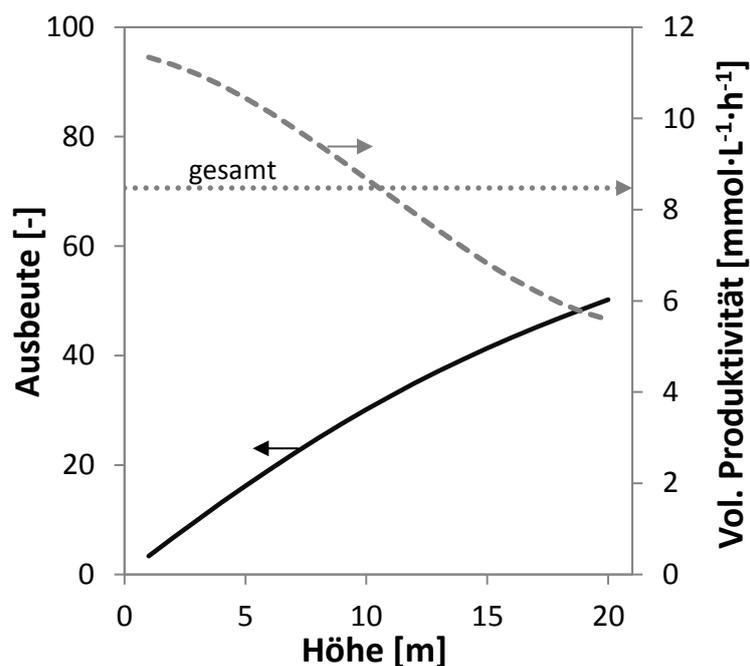


Abbildung 47 : Vereinfachte Abschätzung der fermentativen Oxidation von Butan in der Blasensäule mit 20 Meter Höhe und 80 mm Innendurchmesser bei 30°C und 0,7 L·min⁻¹ bei 3 bar (abs.) am Säulenboden und 14 % v/v Butan.

Im Idealfall sollte somit maximal die abgeschätzte Produktivität/Ausbeute erreichbar sein, realistisch sind jedoch geringere Werte. Liegen die abgeschätzten Werte deutlich niedriger als die Anforderungen an einen industriellen Prozess, ist es unwahrscheinlich, dass unter Einbezug der verringernden und hier nicht betrachteten Effekte der Prozess diese dennoch erfüllen kann. Die Berechnung der einzelnen Höhenglemente der Blasensäule wurde nach

dem Schema in Abbildung 46 durchgeführt. Dabei ist die Berechnungsformel aus 6.4 so modifiziert, dass die vorliegenden Parameter im jeweiligen Höheninkrement einfließen und entsprechend der Skalierungsabschätzung aus 6.5 herunterskaliert werden. Eine tabellarische Berechnung befindet sich im Anhang unter A26. Durch Aufsummierung der Teilausbeuten kann die Gesamtausbeute berechnet werden. Die volumetrische Produktivität wird aus der Gesamtausbeute und dem eingetragenen Stoffstrom (vgl. 4.2.2) berechnet. Abbildung 47 zeigt die volumetrische Produktivität für die jeweiligen Höheninkremente der Blasensäule (grau gestrichelt) und die sich damit ergebende aufsummierte Ausbeute an der entsprechenden Höhe (schwarze Linie). Dabei ergibt sich über das Volumen der gesamten Blasensäule eine mittlere volumetrische Produktivität von über $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und eine Gesamtausbeute von 50 %. Nach diesem Schema können nun die volumetrische Produktivität und sich damit ergebende Ausbeuten für verschiedene Prozessparametereinstellungen durchexerziert werden. Daraus ergibt sich das Prozessfenster für eine 20 Meter Blasensäule mit 80 mm Innendurchmesser in Abbildung 48 im nächsten Kapitel.

6.6.4 Prozessfenster und Prozessbewertung

Als Prozessparameter bei der Skalierungsabschätzung wurden der Butangehalt von 14 % v/v bis 20 % v/v und die Begasungsrate von $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ bis $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ variiert. Letztere wurde aufgrund des gleichen Innendurchmessers und damit gleicher Grundfläche als Leerrohrgeschwindigkeit angegeben, um eine spätere Übertragung auf größere Innendurchmesser zu erleichtern. Die Leerrohrgeschwindigkeit wurde somit zwischen $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ und $1,7 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ variiert. Die Temperatur wurde aufgrund der Charakterisierung (6.3.3) mit 35°C angenommen. Der Druck ist entsprechend durch die Blasensäulenhöhe gegeben. Eine Erhöhung des Gesamtdruckes, durch einen Überdruck am Blasensäulenkopf wurde nicht in Betracht gezogen, da dadurch eine weitere Extrapolation bzgl. des Druckeinflusses nötig gewesen wäre. In dieser Arbeit wurde der Druck nur bis 1,5 bar (abs.) erhöht, weshalb die Blasensäule mit 20 Metern Höhe (3 bar (abs.) im Kopf) außerhalb des charakterisierten Druckbereiches liegt. Sollte der im betrachteten Bereich lineare Anstieg der Produktivität mit der Druckerhöhung auch bei höheren Drücken bestehen bleiben, ist dieses eine effektive Prozessoption, um die Produktivität weiter zu steigern.

Das in dieser Arbeit in der 2 Liter Blasensäule charakterisierte **Prozessfenster** aus Abbildung 33 ist in Abbildung 48 zusätzlich aufgezeigt, wobei auch hier ohne Überdruck am Säulenkopf

bilanziert wurde. Dabei wird ersichtlich, dass durch Vergrößerung der Blasensäulenhöhe eine höhere Ausbeute im idealisierten Rechenbeispiel erzielt werden kann. Die volumetrische Produktivität wird hingegen nur leicht erhöht, wobei durch den unterschiedlichen Druck auch unterschiedliche Gasdichten bei der Begasung vorliegen. Bei 1,5 bar (abs.) ist im 2 L Maßstab eine volumetrische Produktivität von über $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreichbar. Der grobe Bereich der volumetrischen Produktivität bleibt aber im experimentellen Maßstab und im grob skalierten Bereich mit $3,2 - 9,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und $2,8 - 8,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nahezu identisch. Dabei bleibt zu beachten, dass die Approximierung des 20 Meter (100 L) Maßstabes unter Vernachlässigung mehrerer Einflussfaktoren durchgeführt wurde. Durch Koaleszenz der Blasen, Rückvermischung, Verringerung der spezifischen Oberfläche bei Expansion des Gases sowie fehlender Wandeffekte und höheren Mischzeiten ist diese Approximation als idealisiert zu betrachten.

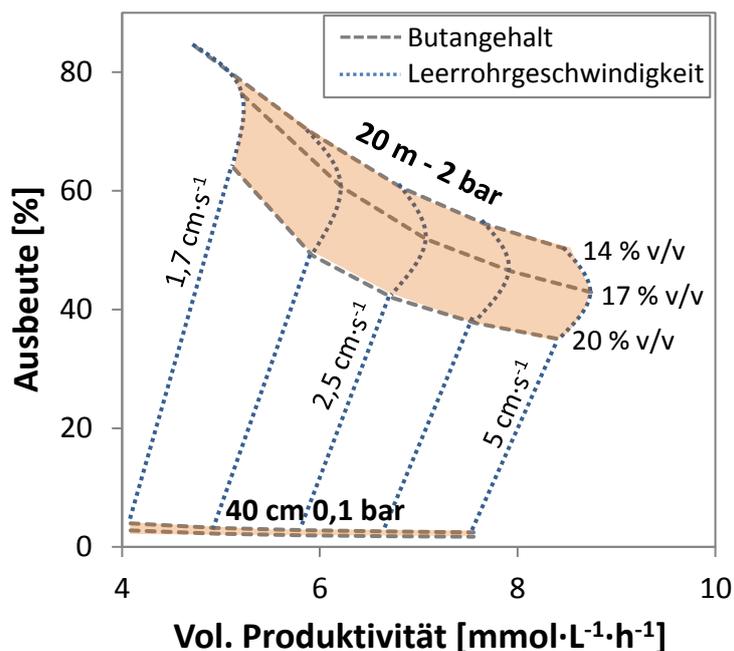


Abbildung 48 : Prozessfenster der Laborblasensäule (2 L - 1,1 bar (abs.)) und der grob abgeschätzten Skalierung auf 20 Meter Höhe mit 3 bar (abs.) für verschiedene Leerrohrgeschwindigkeiten bei 80 mm Innendurchmesser; 35 °C.

Alle diese Einflussfaktoren verringern die Produktivität und Ausbeute, weshalb diese in der Realität geringer ausfallen dürften und die gezeigten Werte als zu hoch verstanden werden sollten. Dennoch zeigt die Kalkulation, dass hohe Ausbeuten von über 70 % nur mit geringen Begasungsraten und dadurch auch geringen vol. Produktivitäten möglich sind. Dabei ist ein $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ Level ($11,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) mit keiner Prozessparameterkombination erreichbar. Zudem wurde für die Skalierungsbetrachtung der Sauerstoffbedarf nur vereinfacht

einbezogen. Dabei wurde für die Berechnung des Volumenstroms die einfache Reaktionsstöchiometrie bzgl. Butan und Sauerstoff von 1:3 angenommen. Pro abreagiertem Butanmolekül zur Buttersäure ist dabei eine Abnahme von drei Sauerstoffmolekülen in die Berechnung des verbleibenden Volumenstromes eingegangen. Hierbei wurde der Sauerstoffverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt, was bei einer genaueren Abschätzung sinnvoll wäre. Weiter ist bei den Approximationen mit hohen Ausbeuten stöchiometrisch nicht ausreichend Sauerstoff vorhanden, wenn Butan mit Luftsauerstoff gemischt wird. Hierfür bedarf es einer Mischung von Butan, Sauerstoff und Stickstoff, wobei das Sauerstoff/Stickstoff-Verhältnis größer als in Luft vorliegen muss. Dabei sind verschiedene Prozessparametereinstellungen stöchiometrisch nur möglich, wenn die Mischung Butan/Sauerstoff/Stickstoff im Explosionsbereich, also unterhalb der oberen Explosionsgrenze liegt. Theoretisch müsste bei Vollumsatz und 14 % v/v Butangehalt der Sauerstoffanteil stöchiometrisch betrachtet minimal bei 42 % v/v liegen. Praktisch betrachtet durch den Erhaltungsstoffwechsel sollte dieser Wert höher liegen. Dabei liegt diese Mischung im Explosionsbereich (vgl. Abbildung 7 und

Anhang 27 : Berechnungsvorschrift für Skalierungsabschätzung; Beispiel mit einer Begasungsrate von 1,5 L·min⁻¹ mit 14 % v/v Butangehalt bei 35°C; Druck auf jedem Höheninkrement über die Flüssigkeitssäule; Atmosphärendruck am Kopf der Blasensäule. Expansion der Gasblasen beim Aufstieg durch Druckabnahme über die Blasensäulenhöhe in die Begasungsrate eingerechnet. Zudem Abnahme des Volumenstromes durch Stofftransport ins Medium berücksichtigt. Vereinfachte Berechnung OHNE Betrachtung von Änderungen des Strömungsverhaltens, Koaleszenz oder Rückvermischung. Berechnung als Maximalabschätzung zu verstehen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Startbegasungsrate:		1,5	L/min						
2	Startbutangehalt		0,14	mol·mol ⁻¹	14					
3	Bodendruck (a)		3	bar						
4	Skalierungsfaktor		0,7	[-]						
5	minimaler O ₂ -Anteil		0,22	mol·mol ⁻¹						
6	Stöchiometrie BUR/OUR		3	mol·mol ⁻¹						
7	Höhe	Druck (a)	α-Begasungsrate	Vol. Prod.	Ausbeute	Δy _{Butan}	ω-Begasungsrate	Ausbeute	Sauerstoff	
9	[m]	[bar]	[L·min ⁻¹]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	[-]	[mol·mol ⁻¹]	[L·min ⁻¹]	[%]	[mol·mol ⁻¹]	
10	1	2,95	1,500	11,341	0,034	0,135	1,472	3,36	0,206	3,3295619
11	2	2,85	1,523	11,178	0,033	0,131	1,495	6,67	0,192	3,0658632
12	3	2,75	1,550	10,972	0,033	0,126	1,521	9,92	0,178	2,8107085
13	4	2,65	1,579	10,727	0,032	0,122	1,551	13,10	0,165	2,5657535
14	5	2,55	1,611	10,445	0,031	0,117	1,584	16,20	0,152	2,334772
15	6	2,45	1,648	10,133	0,030	0,113	1,620	19,20	0,139	2,1121598
16	7	2,35	1,689	9,795	0,029	0,109	1,662	22,10	0,127	1,9028956
17	8	2,25	1,736	9,436	0,028	0,105	1,709	24,90	0,115	1,7144368
18	9	2,15	1,788	9,063	0,027	0,101	1,761	27,58	0,104	1,5438487
19	10	2,05	1,847	8,681	0,026	0,098	1,821	30,15	0,093	1,3893961
20	11	1,95	1,914	8,296	0,025	0,094	1,888	32,61	0,083	1,2492562
21	12	1,85	1,990	7,912	0,023	0,091	1,963	34,96	0,073	1,1232595
22	13	1,75	2,076	7,536	0,022	0,088	2,050	37,19	0,064	1,0094618
23	14	1,65	2,174	7,172	0,021	0,085	2,148	39,31	0,055	0,90596284
24	15	1,55	2,287	6,826	0,020	0,082	2,261	41,34	0,046	0,81281027
25	16	1,45	2,417	6,504	0,019	0,079	2,391	43,26	0,038	0,72932856
26	17	1,35	2,568	6,211	0,018	0,077	2,541	45,10	0,031	0,65539146
27	18	1,25	2,744	5,955	0,018	0,074	2,717	46,87	0,023	0,5903687
28	19	1,15	2,954	5,743	0,017	0,072	2,925	48,57	0,016	0,53201588
29	20	1,05	3,204	5,587	0,017	0,070	3,174	50,23	0,009	0,48041471
30										
31	Gesamtvolumen		100,5	[L]						
33	Gesamt Vol. Prod		8,48	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						
34			747	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						

Berechnung der Spalten:

- Höhe (Spalte A) Höhe der Blasensäule vom Blasensäulenboden gerechnet, bestimmt über die Flüssigkeitssäule von Wasser den Druck
- Druck (Spalte B) Druck auf mittlerer Höhe des Höheninkrements
- αBegasungsrate (Spalte C) Begasungsrate entspricht der über die Druckänderung expandierter Begasungsrate des vorherigen Höheninkrements
- ωBegasungsrate (Spalte G) Begasungsrate nach Abnahme durch den Stofftransport Butan+Sauerstoff ins Medium, Berechnet über die Ausbeute
- Vol. Produktivität (Spalte D) Berechnet mit der Formel auf Basis der Charakterisierung für Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butangehalt

$$Vol. Prod. [mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] = [3,47 \cdot \dot{V} + 1,25 + (p_i - 1,1) \cdot (-0,558 \cdot y_{Bu,0} + 13,117) + (T - 30) \cdot 0,22] \cdot \left(\frac{y_{Bu,i}}{y_{Bu,0}}\right) \cdot 0,7$$

Skalierungswert aus Versuch mit 95 cm Höhe

- Teilausbeute (Spalte E) Berechnet die Ausbeute im jeweiligen Höheninkrement über die vol. Produktivität und den zugeführten Butanstrom
- Butananteil (Spalte F) Berechnet mit der volumetrischen Produktivität wie viel Restbutananteil im Gasstrom vorhanden ist.
- Aufsummierte Ausbeute (Spalte G) Begasungsrate am Ende des Höheninkrements durch die Abnahme des Partialdrucks von Butan und Sauerstoff
- Sauerstoffanteil Berechnet den verbleibenden Sauerstoffanteil im Gas wenn dieser 3:1 mit jedem Butanmolekül abreagiert.
- Gesamt Vol. Produktivität (C34) Mittelwert aller Vol. Produktivitäten aus Spalte D

Anhang 28) und eine entsprechend betriebene Anlage müsste unter den gegebenen Sicherheitsvorschriften (EX-geschützt) betrieben werden.

Für einen **industriell relevanten Prozess** bedarf es noch weiterer Optimierung hinsichtlich der volumetrischen Produktivität. Dabei kann sowohl die weitere Erhöhung der Begasungsrate bzw. der Leerrohrgeschwindigkeit als auch des Systemdrucks in Betracht gezogen werden. In Kombination mit einer Erhöhung der Blasensäulenhöhe könnten damit dann auch höhere Ausbeuten realisiert werden. Mit der Annahme, dass der lineare Einfluss der Begasungsrate auf die Produktivität extrapoliert werden kann, lässt sich nun bestimmen ab welcher Leerrohrgeschwindigkeit industriell relevante Zielgrößen erreicht werden. Für eine volumetrische Produktivität von $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ müsste bei einer 20 Meter Blasensäule ohne Überdruck am Säulenkopf eine Leerrohrgeschwindigkeit von $20 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ($6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) vorliegen. Dabei würde sich die Leerrohrgeschwindigkeit im Vergleich zur höchsten experimentell untersuchten Leerrohrgeschwindigkeit um 400 % erhöhen. Im gleichen Zuge sinkt allerdings die Ausbeute auf ca. 33 %. Auch diese Berechnung beinhaltet die oben genannten Einschränkungen und dient als grobe Abschätzung. Dabei wird deutlich, dass hohe volumetrische Produktivitäten gleichzeitig auch eine Verringerung der Ausbeute bedeuten. Keine der hier betrachteten Kombinationen an Prozessparametern kann den Bereich über $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreichen ohne eine erhebliche Verringerung der Ausbeute. In Abbildung 49 ist die Abhängigkeit der vol. Produktivität von der Ausbeute für die Verläufe der untersuchten Prozessparameter im Prozessfenster aufgetragen. Dabei zeigen die Trendlinien der einzelnen Prozessparameter, inwieweit eine Veränderung der vol. Produktivität und oder der Ausbeute möglich ist, wenn diese variiert werden. Dabei wäre es industriell relevant, möglichst hohe Produktivitäten bei gleichzeitig möglichst hohen Ausbeuten zu erreichen. Die Trends sollten somit möglichst in die rechte obere Ecke des Graphen deuten. Hier wird deutlich, dass eine Erhöhung der volumetrischen Produktivität durch die Erhöhung von Begasungsrate, Temperatur und Druck im untersuchten Prozessfenster möglich ist. Dabei ist die Temperatur als Stellschraube begrenzt, da die Zellen ein Temperaturbereich als Optimum haben und so

die Temperatur nicht beliebig erhöht werden kann (vgl. 6.3.3). Hier sollte eine Temperaturgrenze von 37°C - 40°C sinnvoll sein.

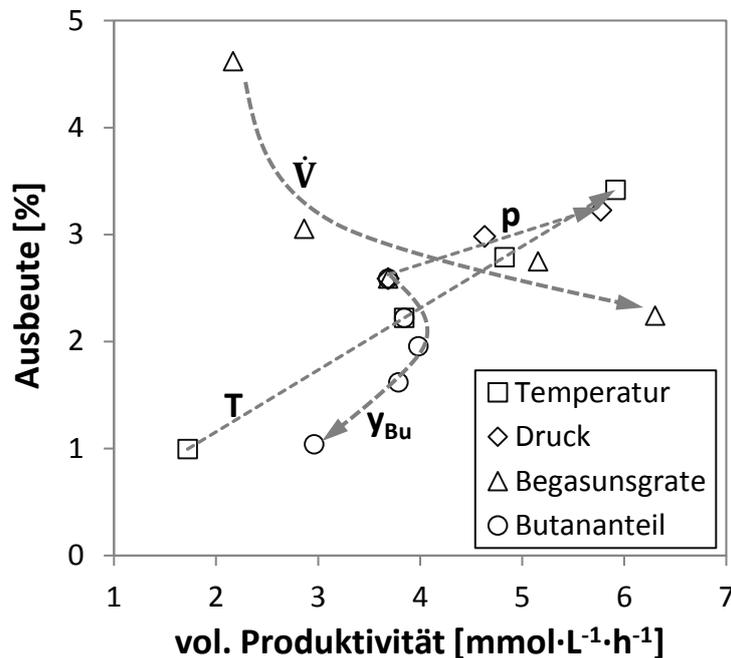


Abbildung 49 : Abhängigkeit der volumetrischen Produktivität von der Ausbeute für die verschiedenen Prozessparameter, welche im Rahmen dieser Arbeit variiert wurden.

Der Druck erhöht im Fall von 14 % v/v die Produktivität analog zum Anstieg des Partialdrucks respektive zum Anstieg des Konzentrationsgradienten. Hier bleibt die Frage, inwieweit dieser Trend extrapoliert werden kann, da die Versuche mit 20 % v/v gezeigt haben, dass eine Druckerhöhung bei diesem Butangehalt die Produktivität verringert. Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Steigerung der Produktivität mit Erhöhung des Druckes mit 14 % v/v Butan auch in ein Maximum läuft und so der Druck als Stellschraube keine lineare Erhöhung der Produktivität erlaubt (vgl. 6.3.4). Durch Erhöhung der Begasungsrate nimmt die Produktivität zu, wobei hier kein direkt linearer Verlauf aus dem Ursprung gegeben ist (vgl. 6.3.1 und 6.3.5). Hier kommt es bei weiterer Erhöhung der Begasungsrate zu einem Maximum der vol. Produktivität. Diese kann nicht beliebig maximiert werden, da ab einer bestimmten Begasungsrate die Erhöhung des Gasblaseneintrags und damit Vergrößerung der Oberfläche und der Veränderung des Strömungsregimes keine Erhöhung des Stofftransportes bedingt, da die Koaleszenz diesem entgegengewirkt. Hier könnte durch den Umstieg auf zwei Begasungsadapter die Ausstromfläche vergrößert werden und dadurch der lineare Trend auch bei höheren Begasungsraten beibehalten werden. Dennoch zeigt die Auftragung in Abbildung 49, dass durch die Erhöhung der Begasungsrate die Ausbeute abnimmt. Mit dem Prozessfenster aus Abbildung 48 wird deutlich, dass in dem verwendeten Versuchsaufbau die

für einen industriell relevanten Prozess gesetzte Produktivitätsuntergrenze von $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit den variierten Prozessparametern nicht erreichbar ist.

Da der Prozess durch den Eintrag von Butan ins Medium, also über den Stofftransport von der Gasblase ins Medium limitiert ist, bringt eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Zellen keine Erhöhung der volumetrischen Produktivität der der Ausbeute. Für eine wirtschaftliche Betrachtung des Systems, ist es dabei sinnvoll eine möglichst hohe spezifische Aktivität der Zellen zu haben, um möglichst geringe Zelldichten einsetzen zu müssen. Da die Zellaufzucht mit Kosten verbunden ist, würde eine Optimierung der Zellen durch verbesserte Induktionsbedingungen, Proteinmodifikation ggf. die eingesetzte Gesamtzellmasse und damit Kosten einsparen. Besonders die Optimierung der Zell- und Enzymstabilität bzgl. höheren Temperaturen wäre von Vorteil, da die Trends der Charakterisierung einen Anstieg der volumetrischen Produktivität mit der Temperatur gezeigt haben. Hier könnte der Einsatz thermophiler Wirtszellen in Kombination mit einem temperaturstabilen Enzymsystem dazu führen, dass die Temperatur und damit die volumetrische Produktivität und Ausbeute weiter erhöht werden könnten. Hier bleibt dabei zu klären inwieweit der Trend der linearen Zunahme der volumetrischen Produktivität mit der Temperatur aus dem betrachteten Bereich von max. 40°C weiter extrapoliert werden kann.

Die Übertragbarkeit des mit der dynamischen Methode gemessenen k_{La} -Wertes konnte quantitativ ausreichend genau gezeigt werden. So kann mit der Produktivitätsuntergrenze berechnet werden, welchen k_{La} -Wert ein Reaktorsystem aufweisen muss, um bei definierten Prozessbedingungen diese zu erreichen. Dabei ist im Folgenden der mit Sauerstoff gemessene k_{La} -Wert gemeint, da dieser einfach zugänglicher ist und für viele Reaktoren bekannt ist. Die sich damit ergebene volumetrische Produktivität ist mit der Zwei Film Theorie auf Butan bei entsprechenden Prozessbedingungen umgerechnet. So wäre bei 30°C mit 14 % v/v und ohne Überdruck ein k_{La} -Wert von 340 h^{-1} nötig (bei 35°C von 400 h^{-1}), um eine vol. Produktivität von $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ aufzuweisen. Bei einem Überdruck von 2 bar und 35°C müsste der k_{La} -Wert mit 14 % v/v mindestens 135 h^{-1} betragen. Da dieser Wert im betrachteten Reaktorsystem im Prozessfenster nicht erreichbar ist und nur ein Überdruck von 0,5 bar beaufschlagt werden kann, wird im Folgenden ein alternatives Konzept für das System im Labormaßstab vorgeschlagen. Dabei kann eine Blasensäule durchaus die Produktivitäts- als auch die Ausbeute-Anforderungen erfüllen. Sollten im industriellen Maßstab die oben

durchexerzierten k_{La} -Werte erreichbar sein, ist ein Blasensäulensetup durchaus sinnvoll. Der in Tabelle 1 aufgezeigte Reaktorvergleich nach Storhas mit Kennzahlen gibt für Blasensäulen einen maximalen k_{La} -Wert von 160 h^{-1} an [36]. Dabei kann die weitere Druckerhöhung neben dem Einfluss auf die maximale Löslichkeit und damit auf den Konzentrationsgradienten auch einen positiven Einfluss auf den Stofftransportkoeffizienten k_{La} haben. Ist ein Effekt bei der in dieser Arbeit vergleichsweise geringen Druckerhöhung bei der Messung des k_{La} Wertes nicht signifikant, zeigen andere Arbeiten, dass hier ein deutlich höherer Stofftransport bei Drücken von 10 bar und höher erreicht werden können [57, 58].

Neben der Steigerung der Produktivität ist die Erhöhung der Ausbeute besonders für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses mitentscheidend. Dabei wäre es nötig, eine Rezyklierung des Butans zu etablieren, um dadurch die Ausbeute steigern zu können. Zudem ist bei einer Rückführung des Butans die Stöchiometrie des Sauerstoffes bei hohen Ausbeuten einfacher zu realisieren, ohne im Explosionsbereich arbeiten zu müssen. So muss in der Blasensäule für hohe Ausbeuten der Sauerstoff stöchiometrisch im Gasstrom schon zu Beginn vorhanden sein. Bei geringerer Verweilzeit und entsprechend geringeren Ausbeuten wird weniger Sauerstoff im Gas benötigt und so lässt sich bei einer Rezyklierung das Butan stets mit neuem Sauerstoff außerhalb des Explosionsbereiches mischen. Im Vergleich zu Blasensäulen sind in Rührkesselreaktoren höhere Gastransporte ins Medium und damit auch höhere volumetrische Produktivitäten erreichbar. Im Falle, dass für eine hohe Ausbeute eine Rezyklierung in Betracht kommt, wäre auch ein Reaktorsetup mit Rührkessel denkbar. Dabei hängt die wirtschaftliche Betrachtung weiter vom herzustellenden Produkt ab. Sollte der Preis des Produktes entsprechend hoch sein, könnte sich eine Blasensäule mit geringerer Produktivität aber hoher Ausbeute wirtschaftlich lohnen. In der Produktion von Bulk-Produkten ist sowohl eine hohe Ausbeute als auch eine hohe volumetrische Produktivität notwendig, um entsprechend kosteneffizient zu produzieren. In diesem Fall wäre ein Rührkesselsetup mit Butanrückführung sinnvoll. Ein entsprechender Fließbildvorschlag ist in Abbildung 50 gezeigt. Hierbei kann das Butan aus dem Abgasstrom kondensiert werden und in einem weiteren Schritt vom Kondenswasser getrennt werden, da die Dichtedifferenz zwischen Butan und Wasser im flüssigen Zustand ca. $0,4 \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ beträgt.

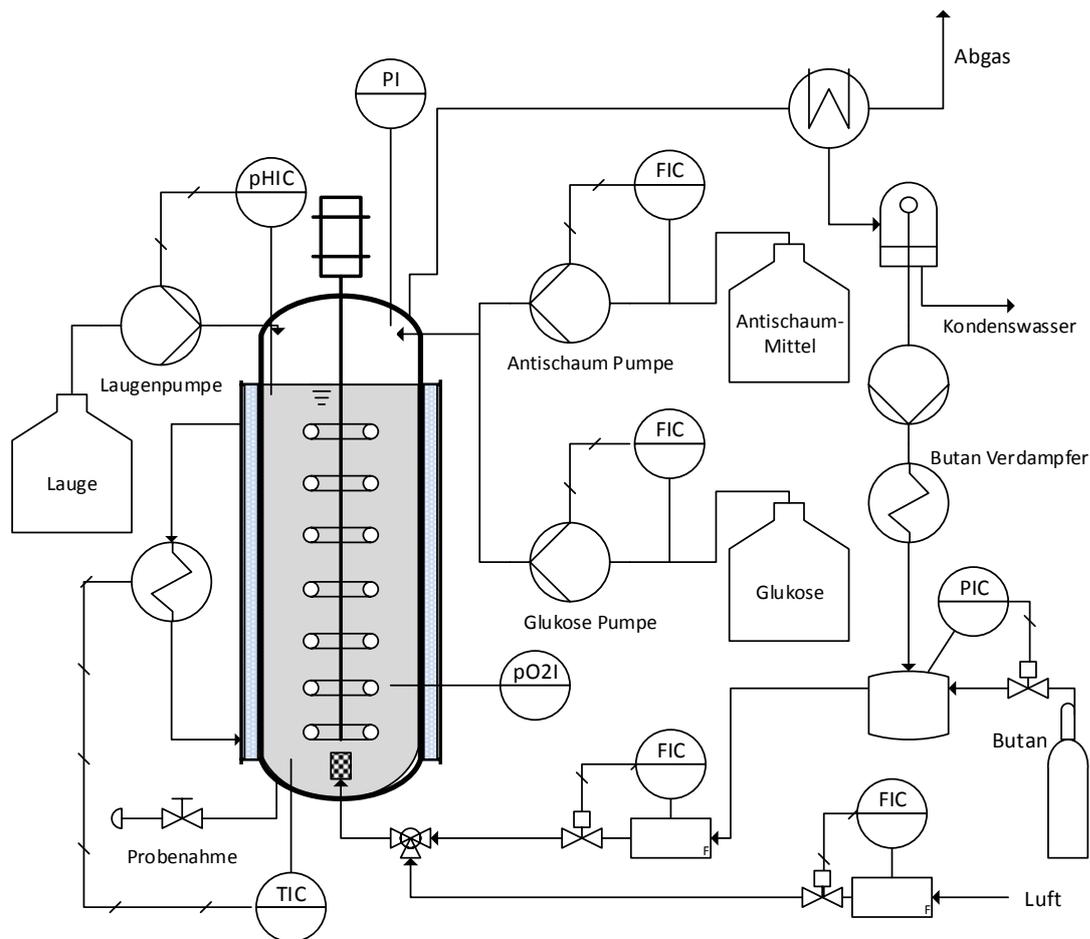


Abbildung 50 : R&I Schema eines Rührkessel zur fermentativen Oxidation von Butan mit Rezyklierung des Butans aus dem Abgasstrom; Kondensation des Butans im Abgas; Trennung des Butankondensates von Strippwasserkondensat (Dichtedifferenz ca. 0,4 kg·L⁻¹).

Von dort lässt sich das Butan in den Butanvorlagetank pumpen und zuvor durch Wärmezufuhr in die entsprechende Gasphase überführen, welche im Reservoir wieder als Vorlage für eine Gasmischstation dient. Dort wird der Butandruck über eine Druckregelung mittels Butanvorratsgasflasche konstant gehalten. Die Gasmischstation mischt dabei das Butan aus dem Prozess und der Gasflasche mit Luftsauerstoff und die Begasung kann dabei außerhalb des Explosionsbereiches realisiert werden und hohe Gesamtausbeuten erreichen. Eine weitere Möglichkeit wäre die gekoppelte Verbrennung des Abgasstromes ggf. mit vorgeschalteter CO₂-Wäsche. So würde nicht umgesetztes Butan wie bisher üblich zur Energie und Wärmegewinnung genutzt und könnte zur Wirtschaftlichkeit des Prozesses dazugerechnet werden. Auch der Einsatz verschiedener Einbauten in die Blasensäule zur Erhöhung des Stofftransportes ist denkbar, wobei Air-Lift Einbauten oder Rührer in Frage kommen.

Ein Aufbau wie in einer Karr-Kolonne mit zentralem Rührorgan und über die Höhe verteilten Rushton-Turbinen würde einen höheren Stoffaustausch begünstigen und der Koaleszenz entgegenwirken. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass dieses Setup besonders im größeren Maßstab die Investitionskosten deutlich erhöhen kann. Darüber hinaus sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen, welche Gegenstand weiterer Forschung sein sollten. Durch die verwendeten vorgemischten Gasflaschen und der daraus resultierenden Maximaldauer der Experimente (in dieser Arbeit ca. 18 Stunden), konnten nur Buttersäurekonzentrationen von $< 4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht werden. Hier ist bei größerer Akkumulation der Buttersäure eine Inhibierung der Zellen unabdingbar. Entsprechende Vorversuche beim Industriepartner zeigten einen linearen Buttersäurekonzentrationsanstieg bis zu $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ohne Inhibierungsmerkmale. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollte die Inhibierung damit keine Signifikanz besitzen. Dennoch sollte ein entsprechendes Verhalten auch im verwendeten Versuchsaufbau verifiziert werden, wobei dazu ein anderes Begasungskonzept zu etablieren ist. Daneben begünstigen höhere Produkttiter einen Produktaustrag aus der Blasensäule mit dem Abgasstrom. Was für das Modellprodukt Buttersäure noch nicht von großer Bedeutung ist, könnte bei anderen, besonders leichtflüchtigeren, Produkten bzgl. der Produktaufreinigung von Interesse sein.

So konnte bei einem Versuch mit zugesetztem Butanol ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) bei $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasung mit Luft bei 30°C und 2 L Medium ein Gesamtproduktaustrag von $7,4 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}$ verzeichnet werden. Dementsprechend ist es theoretisch möglich die Reaktion in einen Gleichgewichtszustand laufen zu lassen, bei dem bei entsprechendem Produkttiter eines leichtflüchtigen Alkohols oder Aldehyd der Austrag aus dem Reaktor gleich hoch wie die Gesamtproduktivität ist.

7 Fehlerbetrachtung

7.1 Analytik & Probenhandhabung

Die Produktanalytik der Buttersäure wurde mittels GC realisiert. Dabei kann es zu Abweichungen bei der Probenvorbereitung kommen. Durch die Verwendung von leicht flüchtigen Ethylacetat als Extraktionsmittel besteht ein Fehlerpotential, da dieses während der Probenvorbereitung und Probenhandhabung verdampfen kann und so den Verdünnungsfaktor verfälscht. Dieses wiederum hat Einfluss auf die Quantifizierung der

Buttersäure. Die Probe wurde direkt nach der Beprobung mit Ethylacetat und HCl (siehe 5.2.1) gemischt. Dabei wurde während der Vorlage des Ethylacetats darauf geachtet, dieses zuvor mindestens eine Stunde auf Eis zu kühlen, um eine Blasenbildung und damit einhergehenden Fehler beim pipettierten Volumen zu vermeiden. Auch wurde zuerst die Salzsäure in das 2 ml Kunststoffröhrchen gegeben, um nach der Zugabe des Ethylacetats und direktes Verschließen des Deckels ein Ausdampfen des leicht flüchtigen Ethylacetats zu minimieren. Zudem wurde bei der Vorlage des Ethylacetat darauf geachtet, alle Probenröhrchen mit der gleichen Pipettenspitze zu befüllen, um eine herstellungsbedingte Variation im Volumen zu verhindern. Weiter wurden die Röhrchen mit Ethylacetat frühestens am Vortag vorbereitet und bis zu Versuchsbeginn im Kühlschrank bei 4°C gelagert, um auch hier ein Ausdampfen zu minimieren. Bei der eigentlichen Probennahme wurde der Probenahmeschlauch am Bodenflansch der Blasensäule durch mehrfaches Aufziehen und Ausdrücken der Probenahmespritze gespült. Dabei ist hier ein großes Fehlerpotential aufgrund von Mischungslücken zu erkennen gewesen. Der Probenahmeschlauch fasst ca. 3 ml vom Reaktorboden bis zum Luer-Lock-Adapter, an den die Spritze angeschlossen wird. In ersten Versuchen wurde mit einer 5 ml Spritze gearbeitet, da diese für das Probenvolumen von 2 ml (0,5 ml für die Analytik & 1,5 ml wurden eingelagert) ausreichten. Dabei wurde die Spritze vor der eigentlichen Probennahme 5-mal mit Medium aufgezogen und wieder in den Reaktor zurückgedrückt. Diese Spülprozedur reicht dabei nicht aus, um zu gewährleisten, dass die Probe möglichst dieselbe Zusammensetzung hat wie das Medium im Reaktor. Durch die Reste an Medium im Probenahmeschlauch bedarf es hier eines intensiveren Spülvorganges, um eine homogene Durchmischung zu erreichen. Durch den Wechsel auf eine 10 ml Spritze und eine Erhöhung der Spülzyklen auf 10-mal vor jeder Probennahme, konnte eine bessere Abbildung der Reaktorkonzentration erreicht werden. So ist der zeitliche Anstieg der Buttersäurekonzentration durch lineare Regression signifikant besser nachdem die Spülprozedur optimiert wurde. Der Regressionskoeffizient konnte dabei von zu Beginn $R^2 = 0,96 - 0,99$ auf konstant $R^2 = 1,00$ für alle Versuche nach der Anpassung der Spülprozedur erhöht werden. Um die Reproduzierbarkeit der Probenahme und nachfolgenden Analytik zu testen wurde in mehreren Versuchen unmittelbar hintereinander gespült, beprobt und entsprechend analysiert.

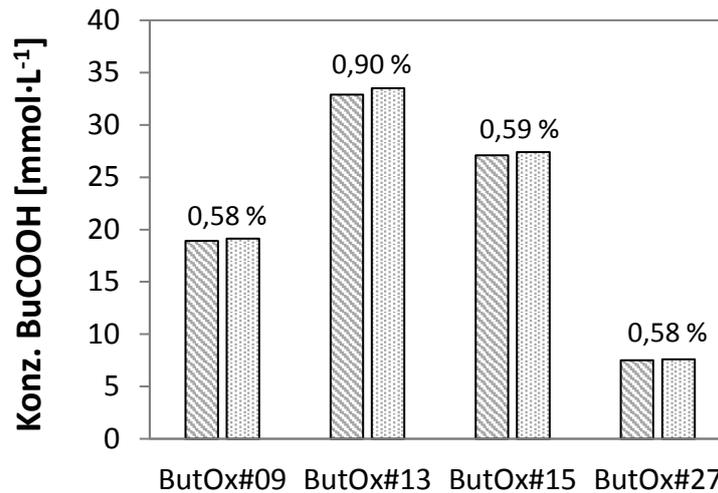


Abbildung 51 : Fehlerabschätzung Probenahme und Analytik; Unmittelbar aufeinanderfolgende Probenahme bei unterschiedlichen Experimenten; zeitlicher Versatz der Probenahme unter 30 Sekunden, relativer Fehler jeweils über den Balkenpaaren; Im Mittel 0,66 % relativer Fehler.

Der zeitliche Versatz der Beprobung lag damit bei weniger als 30 Sekunden. Dabei liegt der durchschnittliche relative Fehler wie in Abbildung 51 gezeigt aus vier unterschiedlichen Versuchen bei 0,66 %.

7.2 Zellhandhabung

Bei der Handhabung mit Zellen im sauerstofflimitierten Zustand, sollte stets darauf geachtet werden, zügig zu arbeiten und die Zellen möglichst schnell in eine nicht-kritische Umgebung zu transferieren. Während in der Hochzelldichtefermentation und bei der Oxidation in der Blasensäule eine Versorgung mit Sauerstoff der Regel entspricht, ist die Sauerstoffversorgung bei der Zellernte, der Lagerung und der Resuspension vor der Oxidation nicht vorhanden. Dabei stellt die Lagerung bei -80°C eine Ausnahme dar, da in diesem Fall kein Zellstoffwechsel vorliegt und dementsprechend die Zellen keinen Sauerstoff benötigen. Während der Zellernte wurde darauf geachtet möglichst zügig zu arbeiten. Dennoch sind die Zellen vom Ende der Hochzelldichtefermentation, über das Zentrifugieren und Aliquotieren der Zellmasse bis zum Einfrieren für ca. 45 Minuten ohne Sauerstoffversorgung. Auch beim Auftauprozess sind die Zellen für ca. 10 Minuten bis zur Resuspension ohne Sauerstoff. Die Sauerstofflimitierung kann zur Zellinaktivierung führen, wobei *E. coli* als Wirtszelle als relativ robust gilt. Entscheidender ist der Aktivitätsverlust durch den Einfrier- und Auftauprozess. Hier wurde in Aktivitätsversuchen mit Butanol als Substrat gezeigt, dass Aktivitätsverluste von bis zu 30 % zwischen frischen Zellen und eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen auftreten können. Um etwaige Schwankungen in der spezifischen Zellaktivität bei der Charakterisierung des

Prozesses zu vermeiden, wurde die eingesetzte Zelldichte stets mit einer konservativ abgeschätzten Minimalaktivität berechnet. Dieses Vorgehen ermöglicht die Vermeidung einer Limitation des Prozesses durch die Zellaktivität, wobei in Abbildung 16 gezeigt werden konnte, dass die Versuche nicht zellaktivitätslimitiert waren. Durch eine Überdimensionierung der Zelldichte ist der ansonsten fehleranfälligen Zellhandhabung und daraus resultierenden spezifischen Zellaktivität entgegenzuwirken. Dabei besteht besonders bei der industriellen Anwendung die Forderung nach möglichst minimalen Zelldichten und damit verbundenen Kosten, weshalb hier eine weitere Untersuchung des Fehlerpotentials der Zellhandhabung sinnvoll ist.

7.3 Versuchsdurchführung & Reproduzierbarkeit

Bei den Versuchen zur Butanoxidation in dieser Arbeit kamen stets vorgemischte Butan/Luft Gasflaschen zum Einsatz. Da die Verwendung der Flaschen mit erheblichem finanziellem Aufwand verbunden ist, wurde die Auswahl der Versuchsbedingungen mit Bedacht durchgeführt. Eine direkte Vergleichbarkeit der Versuche ergibt sich dabei bei zwei verschiedenen Versuchsbedingungssätzen. Zum einen wurde der Versuch mit $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ Begasungsrate mit 14 % v/v bei 30°C doppelt durchgeführt (ButOx#09 und ButOx#10). Die verwendeten Zellen stammen dabei beide aus derselben Hochzelldichtefermentation. Der zweite Versuch wurde mit $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ und 20 % v/v bei 500 mbar Überdruck dreimal durchgeführt (ButOx#26+28+30). Dabei kam es bei Versuch ButOx#30 zu einer anfänglichen Überdosierung der Glukose, weshalb zu Beginn eine Adaptionsphase vorliegt und erst nach Verbrauch der Satzglukose ein linearer Anstieg der Buttersäurekonzentration zu verzeichnen ist. Bei den Versuchen ButOx#09 und ButOx#10 ist aufgrund der nicht optimalen Zufuhr rate an Glukose in der Hochzelldichtefermentation eine Anfangskonzentration an Glukose bei der Butanoxidation vorhanden, deshalb ist auch hier eine Adaptionsphase zu erkennen. Auch hier ist nach dem Verbrauch der Satzglukose der lineare Anstieg sichtbar. Versuche ButOx#09+10 sowie Versuche ButOx#26+28 sind damit auch zeitlich vergleichbar. Dabei stellt ButOx#09+10 mit vorliegender Startkonzentration an Glukose und dementsprechender Adaptionsphase eine nicht optimale Versuchsbedingung dar. Das Versuchspaar ButOx#26+28 stellt dagegen eine Versuchsbedingung ohne Einfluss höherer Glukosekonzentrationen auf den Zellstoffwechsel dar. Dabei ist in Abbildung 52 zu erkennen, dass für beide Fälle eine gute Reproduzierbarkeit der Butanoxidation gegeben ist.

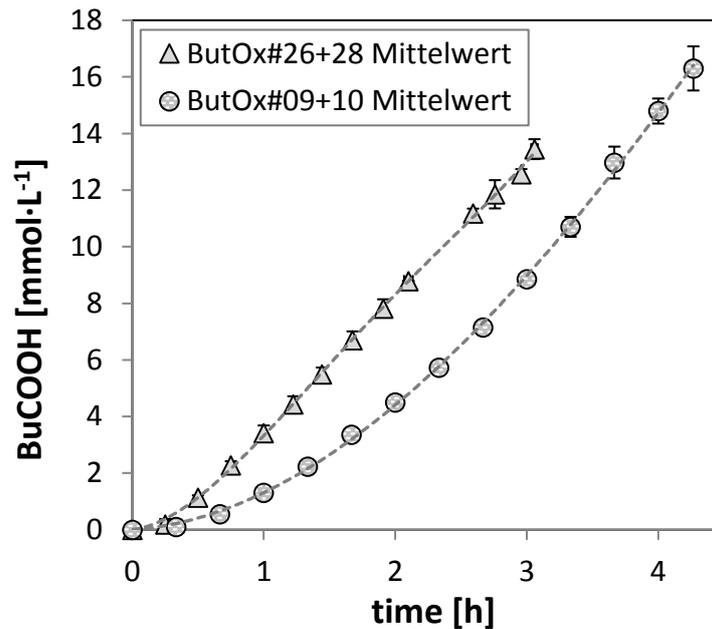


Abbildung 52 : Reproduzierbarkeit bei Doppelbestimmung; Für ButOx#26+28 ergibt sich eine volumetrische Produktivität von $4,79 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit $0,7 \%$ rel. Fehler und für ButOx#09+10 ergibt sich eine volumetrische Produktivität von $6,30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit einem relativen Fehler von $1,4 \%$.

Der relative Fehler liegt für die einzelnen Messpunkte im Mittel bei ButOx#09+10 bei $3,7 \%$ und bei ButOx#26+28 bei $4,25 \%$. Weiter kann die volumetrische Produktivität über die lineare Regression des zeitlichen Anstieges der Buttersäurekonzentration bestimmt werden. Dabei ergibt sich so für ButOx#09+10 eine volumetrische Produktivität von $6,30 \pm 0,09 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit relativem Fehler von $1,4 \%$. Für die Versuche ButOx#26+28+30 ergibt sich im Mittel eine volumetrische Produktivität von $4,73 \pm 0,03 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mit relativem Fehler von $0,7 \%$. Dabei ist am Beispiel der Versuche ButOx#26+28+30 zu erkennen, dass sich im Falle des Versuches ButOx#30 eine erhöhte Glukosekonzentration zu Versuchsbeginn nicht auf die spätere lineare Regression auswirkt. In Abbildung 53 ist dabei der zeitliche Verlauf der Buttersäurekonzentration für die Versuche ButOx#26+28+30 aufgetragen. Bei dem Versuch ButOx#30 wurde vor Versuchsbeginn aufgrund eines Bedienfehlers die Vorfüllfunktion des Glukosezufuhrschlauches nicht rechtzeitig gestoppt, sodass Glukoselösung mit erhöhter Rate zugeführt wurde. Dieses führte zu einer initialen Glukosekonzentration von ca. $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in der Blasensäule. Trotz dieser zu Anfang vorliegender Varianz des zeitlichen Verlaufes der Buttersäurekonzentration kann eine mittlere volumetrische Produktivität für alle drei Versuche mit einem relativen Fehler von $0,7 \%$ bestimmt werden. Eine Reproduzierbarkeit ist somit auch unter nicht idealen Versuchsbedingungen ausreichend gewährleistet.

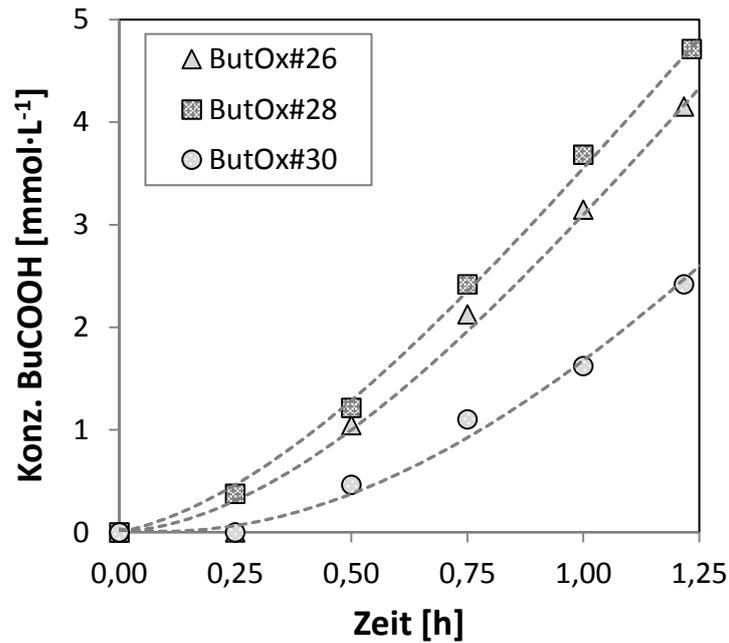


Abbildung 53 : Zeitlicher Verlauf der Buttersäurekonzentration bei $0,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ mit 20 % v/v Butan bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 500 mbar; ButOx#30 mit $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose Konzentration; vol. Produktivität [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] bei ButOx#26 = 4,71, ButOx#28 = 4,78 und ButOx#30 = 4,71

Dabei sind bei den Versuchen ButOx#26+28+30 die Versuchsparameter konstant gehalten worden, während die Zelldichte variiert wurde. Hierbei ist die Zellaktivität über die Zelldichte so hoch eingestellt worden, sodass der Stofftransport ins Medium limitierend ist. Für den Fall, dass eine Limitierung durch das biologische System respektive die Gesamtzellaktivität vorliegt, ist die in den Experimenten gezeigte Reproduzierbarkeit nur bedingt übertragbar. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, falls ein entsprechend durch die Zellen limitierendes System charakterisiert werden sollte.

8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die fermentative Oxidation in der Blasensäule im 2-Liter-Maßstab mit einer Füllhöhe von 40 cm etabliert und charakterisiert. Dabei konnten Produktivitäten bis zu $9,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ und Ausbeuten bis 6,2 % erreicht werden. Aufbauend auf diese Ergebnisse wird am Institut für Technische Biokatalyse eine Skalierung des Blasensäulen-Aufbaus durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigte Übertragbarkeit mittels k_{La} -Wert erlaubt eine Abschätzung des Prozesses in weitere Bioreaktoren und kann im skalierten Blasensäulenreaktor validiert werden. Im Folgeprojekt wird dabei eine Blasensäule mit 15 cm Innendurchmesser und einer Höhe bis 2 Meter aufgebaut, wobei in dem geplanten Reaktor sowohl Experimente mit selben H/D-Verhältnis wie in dieser Arbeit möglich sind, darüber hinaus auch bis zu einem H/D-Verhältnis von 13 mit Erhöhung der Blasenverweilzeit und Steigerung der Ausbeute. Zudem kann bei der geplanten Blasensäule ein Überdruck von bis zu 2 bar beaufschlagt werden, was eine Simulation einer 20 Meter Flüssigkeitssäule erlaubt. Dementsprechend kann die erste Abschätzung eines größeren Maßstabes, welche in dieser Arbeit durchgeführt wurde, mit der zukünftigen Blasensäule validiert werden.

Zudem sollte die Versuchszeit und Variabilität der Butan-Luft-Mischung mit Hilfe einer Gasmischstation optimiert werden. Diese soll an das konstruierte Kontrollsystem angeschlossen werden und ermöglicht beliebige Alkan-Luft-Mischungen außerhalb des Explosionsbereiches. Damit ergeben sich längere Versuchszeiten, um höhere Produkttiter zu generieren und ein Stripping der Produkte sowie eine etwaige Inhibierung der Zellen bei höheren Konzentrationen zu quantifizieren. Zudem erlaubt der geplante Reaktor die Modifikation mit einem Rührorgan, um den Stofftransport als auch die volumetrische Produktivität in den Bereich industrieller Relevanz zu steigern.

Es könnten mit dem in dieser Arbeit diskutierten Rezyklierungskonzept und einem Reaktor mit ausreichendem Stoffeintrag ins Medium hohe volumetrische Produktivitäten in Kombination mit hohen Ausbeuten erreicht werden. Dabei muss vor einer entsprechenden industriellen Nutzung zuerst die weitere fermentative Funktionalisierung des Produktes Buttersäure etabliert werden. Erst mit einem ökonomisch sinnvollen Wertprodukt ist auf lange Sicht die industrielle Nutzung von gasförmigen kurzkettigen Alkanen als Substrat für eine fermentative Produktion interessant. Durch entsprechende Skalierung und damit verbundene Erhöhung der Ausbeute könnte die fermentative Butanoxidation ökonomisch interessant werden.

9 Zusammenfassung

Butan fällt im kt/a-Maßstab als Nebenprodukt bei der Raffinierung von Erdöl an und wird größtenteils zur Energie- und Wärmegewinnung verfeuert. Das hier untersuchte und in *E. coli* exprimierte AlkBGT Enzymsystem ist dabei ein robustes Modellsystem mit hoher Butanaufnahmerate, um die fermentative Oxidation unter moderaten Prozessbedingungen zu betreiben. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Etablierung und Charakterisierung der fermentativen Oxidation von Butan im Blasensäulenreaktor zu evaluieren. Der Modellorganismus oxidiert das Butan bis zur Buttersäure ohne Akkumulation von Intermediaten und erlaubt eine ideale Stoffbilanzierung aufgrund von Löslichkeit und Dampfdruck des Produktes.

In einem ersten Schritt wurde das Reaktorsystem ausgelegt und konstruiert, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Blasensäulen ein Arbeitsvolumen von 2 L mit einem H/D-Verhältnis von 5 bei 80 mm Innendurchmesser aufweisen und die Sicherheitsaspekte in der Handhabung von Butan/Luft-Gemischen im Vordergrund standen.

Die Zellanzucht wurde in einem Rührkesselfermenter mit 2,5 L Arbeitsvolumen im Zulaufverfahren durchgeführt, wobei die dabei gewonnenen Zellen vor den jeweiligen Oxidationsversuchen bei -80°C gelagert wurden. Alle Oxidationsversuche wurden mit Glukosezufuhr in Minimalmedium durchgeführt, um die Kofaktorregenerierung und den Erhaltungsstoffwechsel zu gewährleisten. Die Begasung mit dem Butan-Luft Gemisch aus vorgemischten Gasflaschen erfolgte über einen Sinterzylinder mit 2 µm Porendurchmesser. Aufgrund des geringen Kondensationsdruckes von Butan sind dabei nur geringe Drücke von max. 11 bar in der Gasflasche möglich und es ergaben sich mit den unterschiedlichen Begasungsraten Versuchsdauern von 3 Stunden bis 18 Stunden. Ebenso wurde die Zellaktivität in den Experimenten hinreichend hoch gewählt, sodass der Butaneintrag/Stofftransport ins Medium stets limitierend war und eine Limitation durch das biologische System ausgeschlossen werden konnte. Auf eine ausreichend hohe Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium als Zweitsubstrat wurde bei allen Versuchen geachtet. Zur Charakterisierung des Prozesses wurden die relevanten Prozessparameter Begasungsrate, Druck, Temperatur und Butangehalt variiert und deren Einfluss auf die Zielgrößen volumetrische Produktivität und Ausbeute bestimmt. Die Begasungsrate des Butan-Luft-Gemisches wurde zwischen $0,25 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,125 vvm) und $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,75 vvm), die Temperatur zwischen 25 °C und 40 °C, der Druck zwischen 1,1 bar und 1,5 bar und der

Butangehalt zwischen 14 % v/v und 28 % v/v variiert. Im betrachteten Bereich stieg die volumetrische Produktivität mit der Begasungsrate um 290 % auf einen Maximalwert von $6,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ an. Weiter stieg die Produktivität mit zunehmender Temperatur in den entsprechenden Grenzen um 270 % auf $5,9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Durch die Erhöhung des Druckes konnte ein Anstieg der vol. Produktivität um 160 % auf $4,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ erreicht werden. Mit den über die dynamische Messmethode mit Luftsauerstoff gemessenen k_{La} -Werten ergab sich für die Prozessparameter Begasungsrate, Druck und Temperatur eine Übertragbarkeit zum aus der volumetrischen Produktivität berechneten k_{La} -Wert. Hier liegen die Übertragungsfehler bei unter $\pm 5 [\text{h}^{-1}]$ und erlauben die Übertragbarkeit in andere Reaktorsysteme. Die Erhöhung des Butananteils resultierte in einer marginalen Erhöhung der Produktivität bis zu einer Konzentration von 20 % v/v. Danach nahm die Produktivität mit steigendem Butangehalt bis 28 % v/v wieder ab. Dieses Ergebnis widerspricht dem allgemeinen Verständnis des Stofftransportes und dem Einfluss des Partialdruckes auf den Konzentrationsgradienten als Triebkraft für den Stofftransport des Gases über die Phasengrenze ins Medium. Hier bedarf es zur genauen Klärung des Effektes weiterer Untersuchungen, jedoch bringt die Erhöhung dieses Prozessparameters nicht die erwartete Produktivitätszunahme.

Da der Butangehalt als Stellschraube zur Erhöhung der volumetrischen Produktivität wegfällt, die Temperatur durch die Anforderungen der meisten geeigneten Mikroorganismen begrenzt ist, stellen die reaktorspezifische optimale Begasungsrate und der Systemdruck die wichtigsten Stellschrauben zur Produktivitätssteigerung dar. Bei einem Überdruck von 2 bar wäre bei 35°C mit 14 % v/v ein k_{La} -Wert von 135 h^{-1} nötig, um eine volumetrische Produktivität von $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ zu erreichen.

Mit den Trends der Charakterisierung wurde eine Berechnungsvorschrift für die volumetrische Produktivität anhand der relevanten Prozessparameter für das verwendete Reaktorkonzept erstellt. Weiter wurde eine Berechnungsvorschrift für die vol. Produktivität auf Basis des reaktorspezifischen k_{La} -Wertes vorgelegt, um eine Übertragbarkeit zu anderen Reaktoren zu ermöglichen. Es erfolgte eine Validierung des Optimums im Prozessfenster bei einem relativen Fehler von $< 1 \%$. Dabei konnte eine volumetrische Produktivität von $9,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei einer Ausbeute von 2,7 % erreicht werden.

Um eine erste Abschätzung für eine Skalierung zu ermöglichen, wurde das Prozessvolumen um 150 % bei gleichem Innendurchmesser auf 5 L erhöht ($H/D = 12$). Dabei konnte gezeigt

werden, dass durch die Erhöhung der Verweilzeit der Gasblasen eine Erhöhung der Ausbeute um 82 % auf über 5 % erreicht werden konnte.

Eine erste theoretische Abschätzung hin zu Blasensäulenhöhen von 20 Metern mit 3 bar abs. am Säulenboden zeigte, dass auch im idealisierten Fall für hohe Ausbeuten bei industriell relevanter vol. Produktivität eine Rezyklierung des Butans notwendig wird. Deshalb wurde ein angepasstes Reaktorkonzept für den Labormaßstab vorgeschlagen, bei dem neben einem eventuellen Umstieg zu einem Rührkesselreaktor zudem eine Butanrückführung installiert ist. Die in dieser Arbeit gewonnenen Charakterisierungsdaten und Validierungen, die Übertragbarkeit mittels k_{La} -Wert und das vorgeschlagene Reaktorkonzept bilden dabei die Basis für weitere Untersuchungen und für eine Etablierung der fermentativen Butanoxidation für zukünftige Produktspektren im Industriemaßstab.

10 Literaturverzeichnis

- [1] B. Riediger, Die Verarbeitung des Erdöles, Springer-Verlag, 2013.
- [2] D. Munz und T. Strassner, „Alkane C–H functionalization and oxidation with molecular oxygen,“ *Inorganic Chemistry* 54(11), pp. 5043-5052, 2015.
- [3] R. Schlögl, „Concepts in Selective Oxidation of Small Alkane Molecules,“ in *Modern Heterogeneous Oxidation Catalysis: Design, Reactions and Characterization*, 1-42, 2009.
- [4] J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid und B. Witholt, „Practical issues in the application,“ *Trends in Biotechnology Vol. 21 No. 4*, pp. 170-177, 2003 .
- [5] J. van Beilen und E. Funhoff, „Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications,“ *Current Opinion in Biotechnology*, p. 16:308–314, 2005.
- [6] Z. Li, J. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, A. de Raadt, H. Griengl und B. Witholt, „Oxidative biotransformations using oxygenases,“ *Current Opinion in Chemical Biology*, p. 6:136–144, 2002.
- [7] M. Schrewe, M. K. Julsing, B. Buehler und A. Schmid, „Whole-cell biocatalysis for selective and productive C–O functional group introduction and modification,“ *Chemical Society Reviews* 42(15), pp. 6346-6377, 2013.
- [8] M. Demler und D. Weuster-Botz, „Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*,“ *Biotechnology and Bioengineering* 108(2), pp. 470-474, 2011.
- [9] F. Rojo, „Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes,“ *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, pp. 781-797, 2010.
- [10] J. van Beilen und E. Funhoff, „Alkane hydroxylases involved in microbial,“ *Appl. Microbiol. Biotechnology*, pp. 74:13-21, 2007.

- [11] B. Witholt, „Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential,“ *Trends in biotechnology* 8, pp. 46-52, 1990.
- [12] M. Mohammadi, G. D. Najafpour, H. Younesi, L. P., M. H. Uzir und A. R. Mohamed, „Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review,“ *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, pp. 4255-4273, 2011.
- [13] K. Klasson, M. Ackerson, E. Clausen und J. Gaddy, „Bioreactor design for synthesis gas fermentations,“ *Fuel*, 70, pp. 605-614, 1991.
- [14] P. C. Munasinghe und S. K. Khanal, „Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges,“ *Bioresource technology* 101.13, pp. 5013-5022, 2010.
- [15] A. M. Henstra, J. Sipma, A. Rinzema und A. J. Stams, „Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production,“ *Current Opinion in Biotechnology* 18(3), pp. 200-206, 2007.
- [16] M. D. Bredwell, P. Srivastava und R. M. Worden, „Reactor design issues for synthesis-gas fermentations,“ *Biotechnology progress*, 15(5), pp. 834-844, 1999.
- [17] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad und J. M. Woodley, „Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes,“ *Organic Process Research & Development*, 15(1), pp. 266-274, 2010.
- [18] S. Ashfaq und M. Al-Dahhan, „Scale-up of Bubble Column Reactors: A Review of Current State-of-the-Art,“ *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52.24, pp. 8091-8108, 2013.
- [19] K. Ekambara und J. B. Joshi, „CFD simulation of residence time distribution and mixing in bubble column reactors,“ *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 81(3-4), pp. 669-676, 2003.
- [20] R. J. Philips, L. R. Huhnke und H. K. Atiyeh, „Syngas Fermentation: A Microbial Conversion,“ *Fermentation*, pp. 3, 28, 2007.

- [21] H. Latif, A. A. Zeidan, A. T. Nielsen und K. Zengler, „Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms,“ *Current Opinion in Biotechnology* 27, pp. 79-87, 2014.
- [22] L. Hilterhaus, O. Thum und A. Liese, „Reactor concept for lipase-catalyzed solvent-free conversion of highly viscous reactants forming two-phase systems,“ *Organic Process Research & Development* 12.4, pp. 618-625, 2008.
- [23] O. Thum, L. Hilterhaus und A. Liese, „Process for enzymatically preparing carboxylic esters“. Patent U.S. Patent No. 8,216,813, 10 Jul. 2012.
- [24] P. Engel, T. Haas, J. C. Pfeffer, O. Thum und C. Gehring, „Process for oxidizing alkenes employing the *Pseudomonas putida* GPo1 AlkB monooxygenase“. European Patent Application Patent EP 2 620 504 A1, 25 01 2012.
- [25] J. Pfeffer, T. Haas, O. Thum, F. Erhardt und E.-M. Wittmann, „Verfahren zur Oxidation von Alkanen unter Verwendung der AlkB Alkan 1-Monooxygenase“. Europäische Patentanmeldung Patent EP 2 602 328 A1, 5 12 2011.
- [26] O. Thum, J. C. Pfeffer, P. Engel, C. Gehring und M. Pötter, „Biotechnological production of alcohols and derivatives thereof“. European Patent Application Patent EP 2 607 479 A1, 22 12 2011.
- [27] C. Gehring, M. Wessel, S. Schaffer und O. Thum, „The Power of Biocatalysis: A One-Pot Total Synthesis of Rhamnolipids from Butane as the Sole Carbon and Energy Source,“ *ChemistryOpen* 5.6, pp. 513-516, 2016.
- [28] O. Thum, P. Engel, C. Gehring, S. Schaffer und M. Wessel, „Methods of Producing Rhamnolipids“. Patent U.S. Patent Application No. 15/311, 850, 2017.
- [29] A. Liese, K. Seelbach und C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [30] H. Chmiel, *Bioprozesstechnik*, 3. Auflage Hrsg., Heidelberg: Spektrum, 2011.

- [31] G. De Gonzalo und P. Dominguez de Maria, *Biocatalysis: An Industrial Perspective*, Royal Society of Chemistry, 2017.
- [32] F. Garcia-Ochoa und E. Gomez, „Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview,“ *Biotechnology Advances* 27, pp. 153-176, 2009.
- [33] W.-D. Deckwer, *Reaktionstechnik in Blasensäulen*, Salle, Frankfurt , 1998.
- [34] M. Kraume, „Blasensäulen,“ in *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, pp. 603-635.
- [35] K. Schügerl, „Apparative Aspekte von Blasensäulen-Bioreaktoren,“ *Chemie Ingenieur Technik* 49 (8), pp. 605-611, 1977.
- [36] Deckwer W.-D., „Blasensäulen-Reaktoren - ihre modellmäßige Erfassung und Berechnung,“ *Chemie Ingenieur Technik*, März 1977.
- [37] J. J. Orgill, H. K. Atiyeh, M. Devarapalli, J. R. Phillips, R. S. Lewis und R. L. Huhnke, „A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, hollow fiber membrane and stirred tank reactors,“ *Bioresource technology*, 133, pp. 340-346, 2013.
- [38] W. Storhas, *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg, 1994.
- [39] B. D. Heijstra, C. Leang und A. Juminaga, „Gas fermentation: cellular engineering possibilities and scale up,“ *Microbial cell factories*, 16(1), p. 60, 2017.
- [40] F. R. Bengelsdorf, M. Straub und P. Dürre, „Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation,“ *Environmental Technology*, 34(13-14), pp. 1639 - 1651, 2013.
- [41] M. Weber, „Large bubble columns for the oxidation of cumene in phenol processes,“ *Chemical engineering & technology* 25.5, pp. 553-558, 2002.
- [42] J. S. Pérez, E. R. Porcel, J. C. López, J. F. Sevilla und Y. Chisti, „Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors,“ *Chemical Engineering Journal* 124 (1-3), pp. 1-5, 2006.

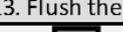
- [43] J. J. Mueller, S. Baum, L. Hilterhaus, M. Eckstein, O. Thum und A. Liese, „Simultaneous determination of mono-, di-, and triglycerides in multiphase systems by online fourier transform infrared spectroscopy,“ *Analytical chemistry* 83(24), pp. 9321-9327, 2011.
- [44] D. Sellin, R. Hiessl, M. Bothe, J. Timmermann, M. Becker, M. Schlüter und A. Liese, „Simultaneous local determination of mass transfer and residence time,“ *Chemical Engineering Journal* 321, pp. 635-641, 2007.
- [45] V. Hilbt, „Chemiepark-Marl - Pressemitteilung Evonik Industries,“ 2015. [Online]. Available: <https://www.chemiepark-marl.de/cms/cpm/de/aktuelles/pages/news-details.aspx?NewsId=54544>. [Zugriff am 22.06.2018].
- [46] M. Schedler, R. Hiessl, A. G. V. Juárez, G. Gust und R. Müller, „Effect of high pressure on hydrocarbon-degrading bacteria,“ *AMB express* 4:77, 2014.
- [47] A. Abdel Megeed und R. Mueller, „Degradation of long chain alkanes by a newly isolated *Pseudomonas frederiksbergensis* at low temperature,“ *Bioremed. Biodiver. Bioavail* 3(2), pp. 55-60, 2009.
- [48] I. E. Staijen, V. Hatzimanikatis und B. Witholt, „The AlkB monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans* synthesis, stability and level in recombinant *Escherichia coli* and the native host,“ *European journal of biochemistry*, 244(2), pp. 462-470, 1997.
- [49] M. Bothe und M. Schlüter, „Modellierungsparameter für Blasenströmungen,“ *Chemie Ingenieur Technik* 85 (7), pp. 1023-1035, 2013.
- [50] Y. T. Shah, B. G. Kelkar, S. Godbole und W.-D. Deckwer, „Design Parameters Estimations for Bubble Column Reactors,“ *AIChE Journal* 28.3, pp. 353-379, 1982.
- [51] M. Millies und D. Mewes, „Phasengrenzflächen in Blasenströmungen - Teil 1: Blasensäulen,“ *Chemie Ingenieur Technik* (68), pp. 660-669, 1996.
- [52] W. Henry, „Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures,“ *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, pp. 29-276, 1803.

- [53] R. Sander, „Henry's Law Constants“, in *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, Gaithersburg MD, 20899, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, August 2018; <https://doi.org/10.18434/T4D303>.
- [54] J. Kane, „Measuring kLa for better bioreactor performance“, *BioProcess International* 10.3, 2012.
- [55] N. H. Abel, L. Schlusemann und M. Grünewald, „Beschreibung von Blasensäulen mithilfe von Kompartiment-Modellansätzen“, *Chemie Ingenieur Technik* 85, Nr. 7, pp. 1112-1117, 2013.
- [56] M. Pötter, A. Schmid, B. Bühler, H.-G. Hennemann, M. Kamiel, S. Schaffer, T. Haas, M. Schrewe, S. Cornelissen, M. Roos und H. Häger, „Biocatalytic oxidation process with AlkL gene product“. Patent US9200043B2, 2010.
- [57] R. Lau, W. Peng, L. G. Velazquez-Vargas, G. Q. Yang und L. S. Fan, „Gas– liquid mass transfer in high-pressure bubble columns“, *Industrial & engineering chemistry research*, 43(5), pp. 1302-1311, 2004.
- [58] P. Rollbusch, M. Bothe, M. Becker, M. Ludwig, M. Grünewald, M. Schlüter und R. Franke, „Bubble columns operated under industrially relevant conditions – Current understanding of design parameters“, *Chemical Engineering Science* 126, pp. 660-678, 2015.
- [59] G. Sluyter, B. Grund, J. Müller, O. Thum, P. Bubenheim und A. Liese, „Prozessentwicklung und Charakterisierung einer fermentativen Oxidation kurzkettiger Alkane“, *Chemie Ingenieur Technik* 88.9, pp. 1250-1250, 2016.
- [60] J. Bailey und D. Ollis, *Biochemical engineering fundamentals*, Chemical Engineering Education, 1976.
- [61] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier, 1995.

11 Anhang

Anhang 1 : Versuchsprotokoll Butanoxidation 1/2	IX
Anhang 2 : Versuchsprotokoll Butanoxidation 2/2	X
Anhang 3 : Versuchsprotokoll Hochzelldichtefermentation	XI
Anhang 4 : Übersicht Butanoxidationen	XII
Anhang 5 : ButOx#09.....	XIII
Anhang 6 : ButOx#10.....	XIII
Anhang 7 : ButOx#11.....	XIII
Anhang 8 : ButOx#12.....	XIV
Anhang 9 : ButOx#13.....	XIV
Anhang 10 : ButOx#15.....	XIV
Anhang 11 : ButOx#16.....	XV
Anhang 12 : ButOx#17.....	XV
Anhang 13 : ButOx#18.....	XV
Anhang 14 : ButOx#19.....	XVI
Anhang 15 : ButOx#21.....	XVI
Anhang 16 : ButOx#22.....	XVI
Anhang 17 : ButOx#23.....	XVII
Anhang 18 : ButOx#24.....	XVII
Anhang 19 : ButOx#25.....	XVII
Anhang 20 : ButOx#26.....	XVIII
Anhang 21 : ButOx#27.....	XVIII
Anhang 22 : ButOx#28.....	XVIII
Anhang 23 : ButOx#29.....	XIX
Anhang 24 : ButOx#30.....	XIX
Anhang 25 : Skalierungsabschätzung: 5 Meter Säulenhöhe bei 80 mm Durchmesser	XX
Anhang 26 : Berechnungsvorschrift für Skalierungsabschätzung; Beispiel1	XXI
Anhang 27 : Berechnungsvorschrift für Skalierungsabschätzung; Beispiel2	XXII
Anhang 28 : Stöchiometrie Butan-Sauerstoff 1:3 bei der Skalierungsabschätzung	XXIII
Anhang 29 : Übersicht k_{La} -Messungen	XXIV
Anhang 30 : HZD - Salzlösung.....	XXV
Anhang 31 : Preparationsverschrift HZD-Medium.....	XXV

Anhang 32 : Preparationsvorschrift HZD-Feed	XXV
Anhang 33 : Preparationsvorschrift M9-Medium	XXVI
Anhang 34 : Preparationsvorschrift Spurenelemente-Stammlösung	XXVI
Anhang 35 : Konstruktionszeichnung Bodenplatte für Blasensäule	XXVII
Anhang 36 : Konstruktionszeichnung Deckelplatte für Blasensäule.....	XXVIII
Anhang 37 : Verhältnis optische Dichte (OD600nm) zu Zelltrockenmasse	XXIX
Anhang 38: Gasflaschenausdauer 50 Liter bei verschiedenen Begasungsraten	XXIX
Anhang 39 : Plasmidkarte von pBT10	XXX

Oxidation of Butane in Bubble Column Reactors				Checkliste ✓	
Number of Experiment:	ButOx#30	Date:	13.03.2018		
Experimental background:					
30. Versuch der Butanoxidation mit E.coli W3110; Temperatur 30°C; 2L Medium in der Blasensäule; Zellen aus HZD#____; 20 % v/v butane bei 500mbar Überdruck mit 0,7 L/min (0,954 L/min)					
1. Wash bubble column with 1% Corsolex solution for 60min via cleaning pump tank					
					
2. Let the Corsolex solution drain off completely back into the cleaning pump tank					
					
3. Wash of Corsolex residue with water via the spray head of the bubble column					
					
4. Flush gassing adapter with water (syringe) and with air (0,2 L/min) to remove corsolex					
					
5. When no foam is visible (2 min washing) stop the steril water feed					
					
6. Keep on gassing with air at 1 L/min until the experiment starts					
					
8. Add antibiotics and M9-salt mix					
Media	Content	Conz. [ml/L]	total [ml]		
M9-Media		-	2000		
Antibiotika	Kanamycin (50g/L)	1	2		
9. Heat up the media to _____ °C and set pH _{SOLL} =6,8 and calibrate DO-Probe at 1013hPa					
					
10. Prepare 50 ml syringe with glucose solution (500 g/kg) and tubing connectors with needle					
					
11. To resuspend the cells from HCD# _____ thaw the Falcon tube in warm water					
					
12. Let the cell block drop into 50 ml syringe and flush into bubble column until (OD=konst.)					
					
13. Turn on the glukose (_____ ml/h) and the antifoam (_____ µl/h) feed					
					
14. Wait for 5 minutes as adaption time for the cells					
					
13. Flush the system with nitrogen					
					
15. Connect the butane gassing and start gassing with _____ L/min of _____ % Butane -Air mixture					
					
16. Take samples due to the timetable from the bubble column and the wash bottle					
					
17. Mix 500 µl of ethylacetate 50µl of 3M HCl and 500µl of sample in an eppi and vortex for 2 min					
					
10. Centrifuge the eppi tube for 3 minutes at 13000 rpm					
					
11. Fill 200 µl of the upper organic phase carefully in an GC vial with insert					
					
12. Analyze in GS with GS_ButOx and name data file according to experiment typ and number					
					

Anhang 4 : Übersicht Butanoxidationen

Versuch:		#09	#10	#11	#13	#23	#15	#12	#16	#19	#21	#22	#17	#18	#26	#28	#25	#30	#31	#32	#33	#34	#35
Prozessparameter	Einheit																						
Begasungsrate	[L·min ⁻¹]	1.5	1.5	1	0.5	0.25	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.954	0.828	0.954	0.954	0.25	0.954	0.76	0.76	0.76	1.82	0.76
Butangehalt	[% v/v]	14	14	14	14	14	17	20	20	17	17	17	14	14	20	20	20	20	28	23	26	14	14
Temperatur	[°C]	30	30	30	30	30	30	30	30	25	34.5	39.5	30	30	30	30	30	30	30	30	30	35	30
Druck	[mbar]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	505	303	500	500	100	500	100	100	100	500	100
OD _{600nm}	[-]	15.3	15.3	14	16.6	6.7	13.5	15.2	12.46	11.7	12	12	13.8	12.0	10	12.5	5.1	14	10	11	10	23	9
Reaktionsvolumen	[ml]	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	5000
Glukose Feedrate	[μl·min ⁻¹]	375	375	375	183	12.5	93.2	183	88.7	30.0	30.0	30	59.0	34.7	27.2	30.0	12.5	40.8	25.0	27.5	25.0	65.0	60.0
	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	31.3	31.3	31.3	15.3	1.0	7.8	15.3	7.4	2.5	2.5	2.5	4.9	2.9	2.3	2.5	1.0	3.4	2.1	2.3	2.1	5.4	5.0
Spezifische Feedrate	[g g _{cow} ⁻¹ ·h ⁻¹]	0.74	0.74	0.80	0.33	0.06	0.21	0.36	0.21	0.08	0.08	0.08	0.13	0.09	0.08	0.07	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
	[mg g _{cow} ⁻¹ ·h ⁻¹]	735	737	804	331	56	207	362	214	77	75	75	128	87	82	72	74	87	75	75	75	85	80
Exp. Ergebnisse	Einheit																						
Vol. Produktivität	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	6.21	6.39	5.16	2.86	2.17	3.69	3.89	3.98	1.72	4.83	5.91	5.77	4.63	4.71	4.86	2.28	4.71	2.96	3.79	2.60	9.37	2.84
Ausbeute	[%]	2.21	2.27	2.75	3.05	4.62	2.59	2.25	1.96	0.99	2.79	3.42	3.22	2.98	1.84	1.90	3.40	1.84	1.04	1.62	0.98	2.75	4.99
DO Mittelwert	[%]	18.8	22	25	20.2	38	10.4	13.5	13.4	60	21	11	37.4	47	46	46	33	32	12	40	28	25	25
Spezifische Aktivität	[mmol·g _{cow} ⁻¹ ·h ⁻¹]	0.81	0.84	0.74	0.31	0.65	0.53	0.45	0.62	0.29	0.80	0.99	0.81	0.76	0.94	0.79	0.83	0.67	0.59	0.76	0.52	0.82	0.57
Berechnete Parameter	Einheit																						
Max. Löslichkeit Butan	[mmol·L ⁻¹]	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.189	0.222	0.224	0.163	0.139	0.213	0.184	0.303	0.303	0.222	0.303	0.311	0.256	0.289	0.180	0.156
Max. Löslichkeit O ₂	[mmol·L ⁻¹]	0.238	0.238	0.238	0.238	0.238	0.238	0.229	0.221	0.249	0.213	0.197	0.325	0.282	0.302	0.302	0.221	0.302	0.199	0.213	0.205	0.299	0.238
C* _{O₂} /C* _{butane}	[-]	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53	1.21	0.99	1.11	1.31	1.42	1.53	1.53	0.99	0.99	0.99	0.99	0.64	0.83	0.71	1.66	1.53
Gelöstsauerstoff	[mmol·L ⁻¹]	0.047	0.055	0.063	0.051	0.095	0.026	0.034	0.034	0.151	0.053	0.028	0.094	0.118	0.115	0.115	0.083	0.080	0.030	0.100	0.070	0.063	0.063
k _a out of vol. prod.	[h ⁻¹]	39.9	41.0	33.1	18.4	13.9	23.7	20.6	17.9	7.7	29.6	42.7	27.1	25.1	15.5	16.0	10.2	15.5	9.5	14.8	9.0	52.1	18.3

Anhang 5 : ButOx#09

Butanoxidation#09				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	02.08.2017	Temp [°C]:	30	ButOx#09 : 14 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 40µl/h und Glukosefeed von [1,5 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#17											
OD _{optimal} [ml]	15,30	Gasflow [L·min ⁻¹]	1,5												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14												
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	18,8												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	375												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments	[-]	BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00							
1	00:20			1,33	0,11	9,36	20	0,33						6,21	
2	00:40			7,46	0,60	52,52	40	0,67							
3	01:00			17,13	1,37	120,60	60	1,00							
4	01:20			28,62	2,29	201,48	80	1,33	0,98						
5	01:40			41,82	3,34	294,41	100	1,67	1,05						
6	02:00			55,04	4,40	387,48	120	2,00	1,08						
7	02:20			68,92	5,51	485,20	140	2,33	1,10						
8	02:40			87,07	6,96	612,97	160	2,67	1,19						
9	03:00			110,07	8,79	774,89	180	3,00	1,32						
10	03:20			129,52	10,35	911,82	200	3,33	1,37						
11	03:40			155,33	12,41	1093,52	220	3,67	1,47						
12	04:00			179,62	14,35	1264,52	240	4,00	1,54						
13	04:20			194,23	15,52	1367,38	260	4,33	1,51						
14	04:37			236,83	18,92	1667,28	277	4,62	1,72						
15	04:38			239,61	19,14	1686,85	278	4,63	1,74						
														548	
														0,81	
														1,48	

Anhang 6 : ButOx#10

Butanoxidation#10				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	10.08.2017	Temp [°C]:	30	ButOx#10 : 14 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 40µl/h und Glukosefeed von [1,5 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#17											
OD _{optimal} [ml]	15,26	Gasflow [L·min ⁻¹]	1,5												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14												
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	22												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	375												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments	[-]	BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00							
1	00:20			1,15	0,09	8,10	20	0,33						6,39	
2	00:40			6,33	0,51	44,56	40	0,67							
3	01:00			15,49	1,24	109,05	60	1,00							
4	01:20			27,26	2,18	191,91	80	1,33	1,00						
5	01:40			42,19	3,37	297,02	100	1,67	1,14						
6	02:00			57,49	4,59	404,73	120	2,00	1,19						
7	02:20			74,31	5,94	523,14	140	2,33	1,25						
8	02:40			91,98	7,35	647,54	160	2,67	1,30						
9	03:00			111,55	8,91	785,31	180	3,00	1,36						
10	03:20			138,34	11,05	973,91	200	3,33	1,50						
11	03:40			169,41	13,54	1192,64	220	3,67	1,64						
12	04:00			190,7	15,24	1342,53	240	4,00	1,66						
13	04:17			214,6	17,15	1510,78	257	4,28	1,72						
														563	
														0,84	
														1,53	

Anhang 7 : ButOx#11

Butanoxidation#11				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	21.09.2017	Temp [°C]:	30	ButOx#11 : 14 Vol-% Butan (Sommer 11bar - 535 L total) ; Neue Antischaumfeedrate von 10µl/h und Glukosefeed von [1,5-1,0 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; 1,0 L /min, Zellen von HZD#19											
OD _{optimal} [ml]	14,00	Gasflow [L·min ⁻¹]	1												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14												
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	25												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	375												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments	[-]	BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00							
1	00:30			4,74	0,38	33,37	30	0,50						5,16	
2	01:04			11,9	0,95	83,78	64	1,07							
3	01:30			29,21	2,33	205,64	90	1,50	1,13						
4	02:09			44,57	3,56	315,77	129	2,15	1,39						
5	02:30			62,24	4,97	438,17	150	2,50	1,43						
6	03:00			84,95	6,79	598,05	180	3,00	1,56						
7	03:30			118,35	9,46	833,18	210	3,50	1,81						
8	04:00			136,78	10,93	962,93	240	4,00	1,77						
9	04:30			175,57	14,03	1236,01	270	4,50	1,96						
10	05:03			202,77	16,20	1427,50	303	5,05	2,02						
11	05:32			254,49	20,33	1791,61	360	6,00	2,30						
12	06:00			286,49	22,89	2016,89	388	6,47	2,36						
13	06:28														
														454	
														0,74	
														2,04	

Anhang 11 : ButOx#16

Butanoxidation#16				Experimenteller Hintergrund									
Datum:	04.01.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#16 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,4 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#32 0,7 L·min ⁻¹									
OD _{600nm, opt}	12,46	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,76										
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	20										
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	13,4										
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	88,7333333										
Versuchsplandaten:				Peakare:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[·]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00	[-]		0	0,00	0,00	0	0,00		92	0	10,2	3,98
1	00:45			28,7	2,29	202,05	45	0,75		92	0,48	11,9	
2	01:30			51,9	4,15	365,38	90	1,50		90	1,24	11,1	
3	02:15			86,5	6,91	608,96	135	2,25		90	1,16	12	
4	03:00			130,9	10,46	921,53	180	3,00		87	1,47	12,1	
5	03:45			134,8	10,77	948,99	225	3,75	0,20	85	1,63	11,8	
6	04:20			158,5	12,66	1115,84	260	4,33		85	1,8	14	
7	04:30			151,1	12,07	1063,74	270	4,50	-1,74	82	1,92	12,9	
8	05:17			227,9	18,21	1604,41	317	5,28	3,85	80	2,3	13,2	
9	06:00			281	22,45	1978,24	360	6,00	1,96	77	2,5	12,7	
10	06:45			332,8	26,59	2342,91	405	6,75	2,11	75	2,86	13,3	
11	07:17			353,5	28,24	2488,64	437	7,28	2,04	108	3	12,7	
12	07:45			372	29,72	2618,88	465	7,75	1,99	108	3,3	13,2	
13	08:15			379,7	30,34	2673,08	495	8,25	1,86	90	4,8	13,3	
14	08:45			415,4	33,19	2924,41	525	8,75	1,94	90	5,2	12,5	
15													1,99
													Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]
													0,62
													Yield [%]
													1,99

Anhang 12 : ButOx#17

Butanoxidation#17				Experimenteller Hintergrund										
Datum:	11.01.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#17 : 14 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,4 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#32 - Bei 500mbar Überdruck 0,7 L·min ⁻¹										
OD _{600nm, opt}	13,80	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,954											
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14											
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	37,4											
Druck [mbar]	505	init.Glu [µl·min ⁻¹]	58,95625											
Versuchsplandaten:				Peakare:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[·]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00	[-]		0	0,00	0,00	0	0,00		80	0	12	200,0	5,83
1	00:30			7	0,56	49,28	30	0,50		80	0	13,2	181,8	
2	00:57			19,7	1,57	138,69	57	0,95		80	0,18	13,1	183,2	
3	01:43			50,7	4,05	356,93	103	1,72	1,81	77,3	0,22	13,8	168,0	
4	02:11			75	5,99	528,00	131	2,18	2,00	75	0,25	13,9	161,9	
5	02:30			93,2	7,45	656,13	150	2,50	2,12	73	0,27	13,4	163,4	
6	03:00			115,5	9,23	813,12	180	3,00	2,09	73	0,24	13,7	159,9	
7	03:30			146,3	11,69	1029,95	210	3,50	2,22	70	0,23	14,4	145,8	
8	04:00			179	14,30	1260,16	240	4,00	2,33	65	0,24	13,9	140,3	
9	04:30			198,6	15,87	1398,14	270	4,50	2,25	60	0,23	13,7	131,4	
10	05:00			245,5	19,62	1728,32	300	5,00	2,49	50	0,25	14,6	102,7	
11	05:30			291,5	23,29	2052,16	330	5,50	2,67	40	0,2	14,2	84,5	
12	05:52			323,9	25,88	2280,25	352	5,87	2,76	30	0,13			
13	06:15			342,8	27,39	2413,31	375	6,25	2,72	30	0	15,1	59,6	
14	06:35			374,8	29,95	2638,59	395	6,58	2,82	30	0	14,2	63,4	
15	06:40			372,1	29,73	2619,58	400	6,67	2,75	30	0			2,70
													Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]	
													0,82	
													Yield [%]	
													2,70	

Anhang 13 : ButOx#18

Butanoxidation#18				Experimenteller Hintergrund										
Datum:	16.01.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#18 : 14 Vol-% Butan (Sommer ~11bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#32 - Bei 300mbar Überdruck 0,7 L·min ⁻¹										
OD _{600nm, opt}	11,98	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,828											
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14											
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	47											
Druck [mbar]	303	init.Glu [µl·min ⁻¹]	34,7											
Versuchsplandaten:				Peakare:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
Proben#	Blasensäule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[·]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00	[-]		0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	12	75,0	4,63
1	00:30			7,6	0,61	53,50	30	0,50		30	0	11,2	80,4	
2	01:00			21,1	1,69	148,54	60	1,00		30	0	11	81,8	
3	01:31			42	3,36	295,68	91	1,52	2,08	30	0	11,7	76,9	
4	02:00			62,4	4,99	439,30	120	2,00	2,13	30	0	11,8	76,3	
5	02:30			80,6	6,44	567,42	150	2,50	2,04	30	0	12,2	73,8	
6	03:00			110,3	8,81	776,51	180	3,00	2,30	30	0	12,3	73,2	
7	03:30			136,1	10,87	958,14	210	3,50	2,37	30	0	11,6	77,6	
8	04:00			150,2	12,00	1057,41	240	4,00	2,21	30	0	11,8	76,3	
9	04:45			194,7	15,56	1370,69	285	4,75	2,38	30	0	12,5	72,0	
10	05:30			238,6	19,06	1679,74	330	5,50	2,49	30	0	11,9	75,6	
11	06:15			282,5	22,57	1988,80	375	6,25	2,56	40	0	12,4	96,8	
12	07:00			323,6	25,86	2278,14	420	7,00	2,59	50	0	12,7	118,1	
13	07:45			343,9	27,48	2421,05	465	7,75	2,46	50	0	12,6	119,0	
14	07:55			353,9	28,28	2491,45	475	7,92	2,48	50	0			2,44
													Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]	
													0,76	
													Yield [%]	
													2,44	

Anhang 14 : ButOx#19

Butanoxidation#19				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	17.01.2018	Temp [°C]:	25	ButOx#19 : 17 Vol-% Butan (Sommer ~9bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#33 - Bei 100mbar und 25°C nach 4h auf 30°C erhöht und Überdruck 0,7 L·min ⁻¹											
OD _{optimal} [NT]	11,70	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,76												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	17												
k _a [h ⁻¹]	100	DO mittel [%]	60												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	30												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Temperatur	Volumetric Productivity
Proben#	Blasenstule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[°C]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	12	75,0	25	1,72
1	00:30			1,4	0,11	9,96	30	0,50		30	0	11,3	79,6	25	
2	01:00			5,9	0,47	41,54	60	1,00		30	0			25	152
3	01:30			16	1,28	112,64	90	1,50	0,93	30	0			25	
4	02:00			25,2	2,01	177,41	120	2,00	0,89	30	0	11,4	78,9	25	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
5	02:30			30,6	2,44	215,42	150	2,50	0,76	30	0			25	
6	03:00			44,7	3,57	314,69	180	3,00	0,90	30	0	11,8	76,3	25	Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]
7	03:30			59,7	4,77	420,29	210	3,50	0,99	30	0			25	
8	04:00			70,8	5,66	498,43	240	4,00	1,00	30	0	11,6	77,6	25	0,29
9	04:17			82,3	6,58	579,39	257	4,28		30	0			30	
10	04:45			105,7	8,45	744,13	285	4,75	2,32	30	0			30	Yield
11	05:15			130,1	10,39	915,90	315	5,25	2,28	30	0	11,7	76,9	30	
12	05:45			150,2	12,00	1057,41	345	5,75	2,14	30	0			30	[%]
13	06:15			180	14,38	1267,20	375	6,25	2,29	30	0			30	
14	06:45			198,1	15,83	1394,62	405	6,75	2,17	30	0	12,1	74,4	30	2,23
15	07:15			224,2	17,91	1578,37	435	7,25	2,21	30	0			30	

Anhang 15 : ButOx#21

Butanoxidation#21				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	25.01.2018	Temp [°C]:	34,5	ButOx#21 : 17 Vol-% Butan (Sommer ~9bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#33 - Bei 100mbar und 30 min Adaption bei 25°C und per Rampe in 6 h auf 35°C erhöht bei 0,7 L·min ⁻¹											
OD _{optimal} [NT]	12,00	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,76												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	17												
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	21												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	30												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Temperatur	Volumetric Productivity
Proben#	Blasenstule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[°C]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	12	75,0	25,1	4,83
1	00:30			2,5	0,20	17,60	30	0,50		30	0	12	75,0	25,2	
2	01:00			8,1	0,65	57,02	60	1,00		30	0	12	75,0	25,7	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
3	01:30			19,9	1,59	140,10	90	1,50	1,09	30	0	12	75,0	26,3	
4	02:00			34	2,72	239,36	120	2,00	1,20	30	0	12	75,0	27,1	425
5	02:30			42,7	3,41	300,61	150	2,50	1,07	30	0	12	75,0	27,9	
6	03:00			62,6	5,00	440,70	180	3,00	1,26	30	0	12	75,0	28,8	Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]
7	03:30			85,9	6,86	604,74	210	3,50	1,44	30	0	12	75,0	29,6	
8	04:00			110,2	8,80	775,81	240	4,00	1,57	30	0	12	75,0	30,4	0,80
9	04:30			128,4	10,26	903,93	270	4,50	1,59	30	0	12	75,0	31,2	
10	05:00			167,5	13,38	1179,20	300	5,00	1,84	30	0	12	75,0	32,0	Yield
11	05:30			189,7	15,16	1335,49	330	5,50	1,86	30	0	12	75,0	32,90	
12	06:00			237,1	18,94	1669,18	360	6,00	2,11	30	0	12	75,0	33,60	[%]
13	06:30			263,9	21,09	1857,85	390	6,50	2,15	30	0	12	75,0	34,40	
14	07:00			290,3	23,19	2043,71	420	7,00	2,17	30	0	12	75,0	35,00	2,18
15	07:09			310,4	24,80	2185,21	429	7,15	2,27	30	0	12	75,0	35,20	

Anhang 16 : ButOx#22

Butanoxidation#22				Experimenteller Hintergrund											
Datum:	30.01.2018	Temp [°C]:	39,5	ButOx#22 : 17 Vol-% Butan (Sommer ~10bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#33 - Bei 100mbar und 60 min Adaption bei 30°C und per Rampe in 2 h auf 35°C und dann 2 std bei 35 und in 2 h auf 40 und dort 1 h bei 0,7 L·min⁻¹											
OD _{optimal} [NT]	12,00	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,76												
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	17												
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	11												
Druck [mbar]	100	init.Glu [µl·min ⁻¹]	30												
Versuchsplandaten:				Peakarea:	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Temperatur	Volumetric Productivity
Proben#	Blasenstule	Comments		BuCOOH	[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µ·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[-]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[°C]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00			0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	12	75,0	30	5,91
1	00:32			8,6	0,69	60,54	32	0,53		30	0	12	75,0	30	
2	01:05			15,2	1,21	107,01	65	1,08		30	0	12	75,0	30	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
3	01:30			23,7	1,89	166,85	90	1,50	0,94	30	0	12	75,0	30,4	
4	02:03			38,9	3,11	273,86	123	2,05	1,13	30	0	12	75,0	31,6	521
5	02:30			50	4,00	352,00	150	2,50	1,13	30	0	12	75,0	32,6	
6	03:18			85,4	6,82	601,22	198	3,30	1,46	30	0	12	75,0	34,6	Specific Activity [mmol·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹]
7	03:45			101	8,07	711,04	225	3,75	1,49	30	0	12	75,0	34,9	
8	04:30			136,1	10,87	958,14	270	4,50	1,63	30	0	12	75,0	35	0,99
9	05:15			162	12,94	1140,48	315	5,25	1,63	30	0	12	75,0	35,1	
10	05:46			184,8	14,77	1300,99	346	5,77	1,67	30	0	12	75,0	35,8	Yield
11	06:15			211,7	16,91	1490,37	375	6,25	1,76	30	0	12	75,0	36,80	
12	06:48			235,5	18,82	1657,92	408	6,80	1,78	30	0	12	75,0	37,90	[%]
13	07:17			266,3	21,28	1874,75	437	7,28	2,94	30	0	12	75,0	39,00	
14	07:47			302	24,13	2126,08	467	7,78	3,12	30	0	12	75,0	39,40	2,98
15	08:10			327,9	26,20	2308,41	490	8,17	3,12	30	0	12	75,0	39,50	
16	08:30			346,7	27,70	2440,76	510	8,50	3,02					39,50	
17	08:45			373,3	29,83	2628,03	525	8,75	3,26					39,50	
18	08:58			403,7	32,26	2842,04	538	8,97	3,58					39,50	

Anhang 17 : ButOx#23

Butanoxidation#23				Experimenteller Hintergrund									
Datum:	06.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#23 : 14 Vol-% Butan (Sommer ~10bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34									
OD _{600nm, opt}	6,7	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,25										
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	14										
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	38										
Druck [mbar]	100	nit.Glu [µl·min ⁻¹]	12,5										
Versuchsplandaten:													
Proben#	Blasen säule	Comments	Peakare: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[l]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[l]	mg g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0:00		12,5	0	5,5	68,2	2,17
1	01:00		15	1,20	105,60	60	1:00		12,5	0	6,3	59,5	
2	02:00		41,5	3,32	292,16	120	2:00	4,52	12,5	0	6	62,5	
3	03:00		68,4	5,47	481,54	180	3:00	4,55	12,5	0			
4	04:00		89,4	7,14	629,38	240	4:00	4,23	12,5	0	6,3	59,5	
5	05:00		116,3	9,29	818,75	300	5:00	4,32	12,5	0			191
6	06:00		140	11,19	985,60	360	6:00	4,26	12,5	0	6,7	56,0	
7	07:00		173,1	13,83	1218,62	420	7:00	4,49	12,5	0	7,3	51,4	
8	08:00		195,3	15,60	1374,91	480	8:00	4,39	12,5	0			
9	09:00		227,6	18,19	1602,30	540	9:00	4,53	12,5	0	7,1	52,8	
10	10:00		260,6	20,82	1834,62	600	10:00	4,65	12,5	0			
11	11:00		282,5	22,57	1988,80	660	11:00	4,56	12,5	0			
12	12:00		308,8	24,67	2173,95	720	12:00	4,55	12,5	0			
13	13:00		347,4	27,76	2445,69	780	13:00	4,72	12,5	0	7,1	52,8	
14	14:00		384,1	29,09	2563,26	840	14:00	4,58	12,5	0			
15	15:00		394,7	31,54	2778,68	900	15:00	4,62	12,5	0			
16	16:00		409	32,68	2879,36	960	16:00	4,48	12,5	0	7,2	52,1	
17	17:00		464,2	37,09	3267,96	1020	17:00	4,79	12,5	0			
18	18:00		477,7	38,17	3363,00	1080	18:00	4,64	12,5	0			
19	19:00		488,7	39,05	3440,44	1140	19:00	4,49	12,5	0	7,3	51,4	
20	19:23		501	40,03	3527,03	1163	19:38	4,51	12,5	0			

Anhang 18 : ButOx#24

Butanoxidation#24				Experimenteller Hintergrund									
Datum:	14.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#24 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34; Beide Glassäulen übereinander und ein Volumen von 5 L ergeben eine Füllhöhe/Mediumsäule von 95 cm Höhe ohne Begasung									
OD _{600nm, opt}	4,80	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,25										
Volume [mL]	5000	Butangehalt [%]	20										
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	5,4										
Druck [mbar]	100	nit.Glu [µl·min ⁻¹]	25,9										
Versuchsplandaten:													
Proben#	Blasen säule	Comments	Peakare: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[l]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[l]	mg g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0:00		28	0	4,5	74,7	1,66
1	00:42		5,2	0,42	36,61	42	0:70		28	0			
2	01:15		15	1,20	105,60	75	1:25		28	0			
3	01:40		23,6	1,89	166,14	100	1:67	6,16	28	0			
4	02:19		34,5	2,76	242,88	139	2:32	5,45	26	0	5,1	61,2	
5	02:50		46,3	3,70	325,95	170	2:83	5,90	26	0			
6	03:20		59,9	4,79	421,70	200	3:33	6,43	26	0			
7	04:00		74,6	5,96	525,18	240	4:00	6,46	25	0			
8	04:25		83,1	6,64	585,02	265	4:42	6,41	25	0			
9	05:08		96,3	7,69	677,95	308	5:13	6,24	25	0			
10	05:35		105,2	8,41	740,61	335	5:58	6,21	25	0			
11	06:15		118,5	9,47	834,24	375	6:25	6,17	25	0			
12	07:00		135,6	10,83	954,62	420	7:00	6,26	25	0			
13	07:30		144,4	11,54	1016,57	450	7:50	6,18	25	0			
14	08:05		156,6	12,51	1102,46	485	8:08	6,18	25	0			
15	08:55		173,7	13,88	1222,85	535	8:92	6,17	25	0			

Anhang 19 : ButOx#25

Butanoxidation#25				Experimenteller Hintergrund									
Datum:	16.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#25 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34									
OD _{600nm, opt}	5,10	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,25										
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	20										
k _a [h ⁻¹]	64,00	DO mittel [%]	33										
Druck [mbar]	100	nit.Glu [µl·min ⁻¹]	12,5										
Versuchsplandaten:													
Proben#	Blasen säule	Comments	Peakare: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose		OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[l]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[l]	mg g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0:00		12,5	0	4,7	79,8	2,28
1	01:00		12,9	1,03	90,82	60	1:00		12,5	0			
2	01:45		31,4	2,51	221,06	105	1:75	2,94	12,5	0			
3	02:25		47,1	3,76	331,58	145	2:42	2,88	12,5	0			
4	03:05		69,2	5,53	487,17	185	3:08	3,22	12,5	0			
5	03:46		87,4	6,98	615,30	226	3:77	3,21	12,5	0			
6	04:26		106,9	8,54	752,57	266	4:43	3,27	12,5	0			
7	05:05		121,2	9,68	853,25	305	5:08	3,16	12,5	0			
8	05:38		136,1	10,87	958,14	338	5:63	3,17	12,5	0	5,5	68,2	
9	06:18		155,4	12,42	1094,01	378	6:30	3,21	12,5	0			
10	07:00		179,8	14,37	1265,79	420	7:00	3,32	12,5	0			
11	07:32		199,2	15,92	1402,37	452	7:53	3,40	12,5	0			
12	08:06		210,6	16,83	1482,62	486	8:10	3,32	12,5	0			
13	08:37		233,4	18,65	1643,13	517	8:62	3,45	12,5	0			
14	09:01		241,8	19,32	1702,27	541	9:02	3,41	12,5	0			
15	09:46		252,7	20,19	1779,01	586	9:77	3,26	12,5	0			

Anhang 20 : ButOx#26

Butanoxidation#26				Experimenteller Hintergrund										
Datum:	21.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#25 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34 bei 500mbar Überdruck - Wahrscheinlich zu wenig Zellen --> OUR<OTR										
OD _{600nm, MIT}	10,00	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,954											
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	20											
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	46											
Druck [mbar]	500	Init.Glu [µl·min ⁻¹]	27,2											
Versuchsplandaten:														
Proben#	Blasenstöße	Comments	Peakarea: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[L]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[L]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	10	90,0	4,71	
1	00:15		0	0,00	0,00	15	0,25		30	0	10	90,0		
2	00:30		0	13,1	1,05	30	0,50		30	0	10	90,0		
3	00:45		26,6	2,13	187,26	45	0,75		28	0	10	84,0		
4	01:00		39,4	3,15	277,38	60	1,00		28	0	10	84,0		
5	01:13		52	4,15	366,08	73	1,22	1,82	28	0	10	84,0		
6	01:26		65,8	5,26	463,23	86	1,43	1,90	26	0	10	78,0		
7	01:40		80	6,39	563,20	100	1,67	1,90	26	0	10	78,0		
8	01:55		93,8	7,49	660,35	115	1,92	1,86	26	0	10	78,0		
9	02:08		110,1	8,80	775,10	128	2,13	1,95	26	0	10	78,0		
10	02:23		123,7	9,88	870,85	143	2,38	1,91	26	0	10	78,0		
11	02:35		137,8	11,01	970,11	155	2,58	1,94	26	0	10	78,0		
12	02:45		142,1	11,35	1000,38	165	2,75	1,83	26	0	10	78,0		
13	02:58		155,1	12,39	1091,90	178	2,97	1,84	26	0	10	78,0		
14	03:05		163,9	13,10	1153,65	185	3,08	1,87	26	0	10	78,0		
15													0,94	
														1,88

Anhang 21 : ButOx#27

Butanoxidation#27				Experimenteller Hintergrund										
Datum:	23.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#27 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34 bei 500mbar Überdruck - Wahrscheinlich zu wenig Zellen --> OUR<OTR										
OD _{600nm, MIT}	17,31	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,954											
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	20											
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	10,2											
Druck [mbar]	500	Init.Glu [µl·min ⁻¹]	41											
Versuchsplandaten:														
Proben#	Blasenstöße	Comments	Peakarea: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[L]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[L]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0,00		30	1,28	10,6	84,9	3,56	
1	00:15		0	0,00	0,00	15	0,25		30	1,28	16,6	54,2		
2	00:32		0	0,00	0,00	32	0,53		30	0,58	16,6	54,2		
3	00:45		5,1	0,41	35,90	45	0,75		28	0	16,6	50,6		
4	01:01		10,3	0,82	72,51	61	1,02		28	0	16,6	50,6		
5	01:15		17,1	1,37	120,38	75	1,25	0,91	28	0	17,7	47,5		
6	01:30		30,1	2,40	211,90	90	1,50	1,28	26	0	17,7	44,1		
7	01:44		40,8	3,26	287,23	104	1,73	1,33	26	0	17,7			
8	01:58		48,9	3,91	344,26	118	1,97	1,27	26	0	17,7			
9	02:15		62,7	5,01	441,41	135	2,25	1,33	26	0	17,7			
10	02:28		71,4	5,70	502,66	148	2,47	1,32	26	0	17,7			
11	02:38		77,5	6,19	545,60	158	2,63	1,30	26	0	17,7			
12	02:48		86,7	6,93	610,37	168	2,80	1,34	26	0	19			
13	02:58		90,8	7,25	639,23	178	2,97	1,29	26	0	19			
14	03:00		94	7,51	661,76	180	3,00	1,32	26	0	19			
15	03:00		95,1	7,60	669,50	180	3,00	1,34	26	0	19			
													0,39	
														1,31

Anhang 22 : ButOx#28

Butanoxidation#28				Experimenteller Hintergrund										
Datum:	27.02.2018	Temp [°C]:	30	ButOx#25 : 20 Vol-% Butan (Sommer ~6bar) ;Antischaumfeedrate von 20µl/h und Glukosefeed von [0,15 ml/gCDW*h] mit 500g/kg Glukosestock; Zellen von HZD#34 bei 500mbar Überdruck										
OD _{600nm, MIT}	12,53	Gasflow [L·min ⁻¹]	0,954											
Volume [mL]	2000	Butangehalt [%]	20											
k _a [h ⁻¹]		DO mittel [%]	46											
Druck [mbar]	500	Init.Glu [µl·min ⁻¹]	30											
Versuchsplandaten:														
Proben#	Blasenstöße	Comments	Peakarea: BuCOOH	Konzentration BuCOOH		Versuchsdauer		Yield [%]	Glukose			OD	Specific Feed	Volumetric Productivity
	[L]	[h:mm]		[mmol·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]	[min]	[h]	Sum	µl·min ⁻¹	[g·L ⁻¹]	[L]	mg·g _{CDW} ⁻¹ ·h ⁻¹	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	
Nullprobe	00:00		0	0,00	0,00	0	0,00		30	0	12,1	74,4	4,86	
1	00:15		4,71	0,38	33,16	15	0,25		30	0	12,9	69,8		
2	00:30		15,2	1,21	107,01	30	0,50		30	0	13,2	68,2		
3	00:45		30,3	2,42	213,31	45	0,75		30	0	12,4	72,6		
4	01:00		46,1	3,68	324,54	60	1,00		30	0				
5	01:14		59	4,71	415,36	74	1,23	1,73	30	0				
6	01:27		71,7	5,73	504,77	87	1,45	1,78	30	0				
7	01:41		87,7	7,01	617,41	101	1,68	1,90	30	0	11,9	75,6		
8	01:54		101,9	8,14	717,37	114	1,90	1,94	30	0				
9	02:04		109,8	8,77	772,99	124	2,07	1,87	30	0				
10	02:16		120	9,59	844,80	136	2,27	1,82	30	0				
11	02:25		133,3	10,65	938,43	145	2,42	1,92	30	0				
12	02:36		142	11,35	999,68	156	2,60	1,87	30	0				
13	02:46		154,6	12,35	1088,38	166	2,77	1,92	30	0				
14	02:57		159,5	12,74	1122,88	177	2,95	1,82	30	0				
15	03:02		172,7	13,80	1215,81	182	3,03	1,95	30	0	12,7	70,9		
													0,79	
														1,87

Anhang 25 : Skalierungsabschätzung: 5 Meter Säulenhöhe bei 80 mm Durchmesser; Berechnung ohne Extrapolation der Druckabhängigkeit der volumetrischen Produktivität; Druck von 1,5 bar durch 5 Meter Flüssigkeitssäule entspricht dem maximalen Druck bei der Charakterisierung; 1,5 L·min⁻¹ Begasungsrate mit 14 % v/v bei 35°C. Vereinfachte Berechnung OHNE Expansion der Gasblasen, Veränderung der Aufstiegs geschwindigkeit oder des Strömungsverhaltens und ohne Betrachtung von Koaleszenz oder Rückvermischung. Berechnung als Maximalabschätzung zu verstehen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Startbegasungsrate:		1,5	L/min	14				
2	Startbutangehalt		0,14	mol·mol ⁻¹					
3	Bodendruck (abs.)		3	bar					
4	Temperatur		35	°C					
5	Skalierungsfaktor		0,7	[-]					
6	minimaler O ₂ -Anteil		0,18	mol·mol ⁻¹					
7	Stöchiometrie BUR/OUR		3	mol·mol ⁻¹					
8									
9	Höhe	Druck (a)	Begasungsrate	Vol. Prod.	Teilausbeute	y _{Butan}	Gesamtausbeute		y _{Sauerstoff}
10	[m]	[bar]	[L·min]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	[-]	[mol·mol ⁻¹]	[%]		[mol·mol ⁻¹]
11	1	1,45	1,5	6,585	0,020	0,137	1,95		0,172
12	2	1,35	1,5	6,092	0,018	0,135	3,76		0,165
13	3	1,25	1,5	5,623	0,017	0,132	5,42		0,158
14	4	1,15	1,5	5,174	0,015	0,130	6,96		0,151
15	5	1,05	1,5	4,745	0,014	0,128	8,36		0,145
31									
32	Gesamtvolumen		26	[L]					
34	Gesamt Vol. Prod		5,64	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]					
35			498	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]					

Berechnung der Spalten:

- Höhe (Spalte A) Höhe der Blasensäule vom Blasensäulenboden gerechnet, bestimmt über die Flüssigkeitssäule von Wasser den Druck
- Druck (Spalte B) Druck auf mittlerer Höhe des Höheninkrements
- Begasungsrate (Spalte C) Begasungsrate entspricht dem zugeführten Volumenstrom (In diesem Beispiel über alle Höhenmeter gleich (Wert D1))
- Vol. Produktivität (Spalte D) Berechnet mit der Formel auf Basis der Charakterisierung für Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butangehalt

$$Vol. Prod. [mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] = [3,47 \cdot \dot{V} + 1,25 + (p_i - 1,1) \cdot (-0,558 \cdot y_{Bu,0} + 13,117) + (T - 30) \cdot 0,22] \cdot \left(\frac{y_{Bu,i}}{y_{Bu,0}}\right) \cdot 0,7$$

Begasungsrate: \dot{V} aus C1 → \dot{V}
Mittlerer Druck im Höhenelement: p_i aus Spalte B → p_i
Initialgehalt an Butan im Gasstrom bestimmt die Steigung der vol. Produktivität bei Druckerhöhung (Wert aus C2) → $y_{Bu,0}$
Temperatur T aus C4 → T
Butangehalt im jeweiligen Höhenelement (Spalte F) - Skalierung der vol. Produktivität auf Grund der Verringerung des Konzentrationsgradienten → $\left(\frac{y_{Bu,i}}{y_{Bu,0}}\right)$
Skalierungswert aus Versuch mit 95 cm Höhe → 0,7

- Teilausbeute (Spalte E) Berechnet die Ausbeute im jeweiligen Höheninkrement über die vol. Produktivität und den zugeführten Butanstrom
- Butananteil (Spalte F) Berechnet mit der volumetrischen Produktivität wie viel Restbutananteil im Gasstrom vorhanden ist.
- Aufsummierte Ausbeute (Spalte G) Begasungsrate am Ende des Höheninkrements durch die Abnahme des Partialdrucks von Butan und Sauerstoff
- Sauerstoffanteil Berechnet den verbleibenden Sauerstoffanteil im Gas wenn dieser 3:1 mit jedem Butanmolekül abreagiert.
- Gesamt Vol. Produktivität (C34) Mittelwert aller Vol. Produktivitäten aus Spalte D

Anhang 26 : Berechnungsvorschrift für Skalierungsabschätzung; Beispiel mit einer Begasungsrate von 1,5 L·min⁻¹ mit 14 % v/v Butangehalt bei 35°C; Druck auf jedem Höheninkrement über die Flüssigkeitssäule; Atmosphärendruck am Kopf der Blasensäule. Vereinfachte Berechnung OHNE Expansion der Gasblasen, Veränderung der Aufstiegsgeschwindigkeit oder des Strömungsverhaltens und ohne Betrachtung von Koaleszenz oder Rückvermischung. Berechnung als Maximalabschätzung zu verstehen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Startbegasungsrate:	1,5	L/min						
2	Startbutangehalt	0,14	mol·mol ⁻¹		14				
3	Bodendruck (abs.)	3	bar						
4	Temperatur	35	°C						
5	Skalierungsfaktor	0,7	[-]						
6	minimaler O ₂ -Anteil	0,22	mol·mol ⁻¹						
7	Stöchiometrie BUR/OUR	3	mol·mol ⁻¹						
8									
9	Höhe	Druck (a)	Begasungsrate	Vol. Prod.	Teilausbeute	Y _{Butan}	Gesamtausbeute		Y _{Sauerstoff}
10	[m]	[bar]	[L·min]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	[-]	[mol·mol ⁻¹]	[%]		[mol·mol ⁻¹]
11	1	2,95	1,5	12,155	0,036	0,135	3,60		0,205
12	2	2,85	1,5	11,360	0,034	0,130	6,97		0,191
13	3	2,75	1,5	10,617	0,031	0,126	10,11		0,178
14	4	2,65	1,5	9,925	0,029	0,122	13,05		0,165
15	5	2,55	1,5	9,277	0,027	0,118	15,80		0,154
16	6	2,45	1,5	8,671	0,026	0,114	18,37		0,143
17	7	2,35	1,5	8,103	0,024	0,111	20,77		0,133
18	8	2,25	1,5	7,571	0,022	0,108	23,02		0,123
19	9	2,15	1,5	7,071	0,021	0,105	25,11		0,115
20	10	2,05	1,5	6,600	0,020	0,102	27,07		0,106
21	11	1,95	1,5	6,157	0,018	0,100	28,89		0,099
22	12	1,85	1,5	5,739	0,017	0,097	30,59		0,092
23	13	1,75	1,5	5,344	0,016	0,095	32,17		0,085
24	14	1,65	1,5	4,970	0,015	0,093	33,65		0,079
25	15	1,55	1,5	4,616	0,014	0,091	35,01		0,073
26	16	1,45	1,5	4,279	0,013	0,089	36,28		0,068
27	17	1,35	1,5	3,959	0,012	0,088	37,46		0,063
28	18	1,25	1,5	3,654	0,011	0,086	38,54		0,058
29	19	1,15	1,5	3,363	0,010	0,085	39,54		0,054
30	20	1,05	1,5	3,084	0,009	0,083	40,45		0,050
31									
32	Gesamtvolumen	100,5	[L]						
34	Gesamt Vol. Prod	6,83	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						
35		602	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						

Berechnung der Spalten:

- Höhe (Spalte A) Höhe der Blasensäule vom Blasensäulenboden gerechnet, bestimmt über die Flüssigkeitssäule von Wasser den Druck
- Druck (Spalte B) Druck auf mittlerer Höhe des Höheninkrements
- Begasungsrate (Spalte C) Begasungsrate entspricht dem zugeführten Volumenstrom (In diesem Beispiel über alle Höhenmeter gleich (Wert D1))
- Vol. Produktivität (Spalte D) Berechnet mit der Formel auf Basis der Charakterisierung für Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butangehalt

$$Vol. Prod. [mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] = [3,47 \cdot \dot{V} + 1,25 + (p_l - 1,1) \cdot (-0,558 \cdot y_{But,0} + 13,117) + (T - 30) \cdot 0,22] \cdot \left(\frac{y_{But}}{y_{But,0}}\right) \cdot 0,7$$

Skalierungswert aus Versuch mit 95 cm Höhe

Begasungsrate: \dot{V} aus C1

Mittlerer Druck im Höhenelement: p_l aus Spalte B

Initialgehalt an Butan im Gasstrom bestimmt die Steigung der vol. Produktivität bei Druckerhöhung (Wert aus C2)

Temperatur T aus C4

Butangehalt im jeweiligen Höhenelement (Spalte F) - Skalierung der vol. Produktivität auf Grund der Verringerung des Konzentrationsgradienten

- Teilausbeute (Spalte E) Berechnet die Ausbeute im jeweiligen Höheninkrement über die vol. Produktivität und den zugeführten Butanstrom
- Butananteil (Spalte F) Berechnet mit der volumetrischen Produktivität wie viel Restbutananteil im Gasstrom vorhanden ist.
- Aufsummierte Ausbeute (Spalte G) Begasungsrate am Ende des Höheninkrements durch die Abnahme des Partialdrucks von Butan und Sauerstoff
- Sauerstoffanteil Berechnet den verbleibenden Sauerstoffanteil im Gas wenn dieser 3:1 mit jedem Butanmolekül abreagiert.
- Gesamt Vol. Produktivität (C34) Mittelwert aller Vol. Produktivitäten aus Spalte D

Anhang 27 : Berechnungsvorschrift für Skalierungsabschätzung; Beispiel mit einer Begasungsrate von 1,5 L·min⁻¹ mit 14 % v/v Butangehalt bei 35°C; Druck auf jedem Höheninkrement über die Flüssigkeitssäule; Atmosphärendruck am Kopf der Blasensäule. Expansion der Gasblasen beim Aufstieg durch Druckabnahme über die Blasensäulenhöhe in die Begasungsrate eingerechnet. Zudem Abnahme des Volumenstromes durch Stofftransport ins Medium berücksichtigt. Vereinfachte Berechnung OHNE Betrachtung von Änderungen des Strömungsverhaltens, Koaleszenz oder Rückvermischung. Berechnung als Maximalabschätzung zu verstehen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Startbegasungsrate:	1,5		L/min						
2	Startbutangehalt	0,14		mol·mol ⁻¹	14					
3	Bodendruck (a)	3		bar						
4	Skalierungsfaktor	0,7		[-]						
5	minimaler O ₂ -Anteil	0,22		mol·mol ⁻¹						
6	Stöchiometrie BUR/OUR	3		mol·mol ⁻¹						
7										
8	Höhe	Druck (a)	α-Begasungsrate	Vol. Prod.	Ausbeute	Δy _{butan}	ω-Begasungsrate	Ausbeute	Sauerstoff	
9	[m]	[bar]	[L·min]	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	[-]	[mol·mol ⁻¹]	[L·min]	[%]	[mol·mol ⁻¹]	
10	1	2,95	1,500	11,341	0,034	0,135	1,472	3,36	0,206	3,5296419
11	2	2,85	1,523	11,178	0,033	0,131	1,495	6,67	0,192	3,0658632
12	3	2,75	1,550	10,972	0,033	0,126	1,521	9,92	0,178	2,6107085
13	4	2,65	1,579	10,727	0,032	0,122	1,551	13,10	0,165	2,1657535
14	5	2,55	1,611	10,445	0,031	0,117	1,584	16,20	0,152	1,7324772
15	6	2,45	1,648	10,133	0,030	0,113	1,620	19,20	0,139	1,3121598
16	7	2,35	1,689	9,795	0,029	0,109	1,662	22,10	0,127	0,9058666
17	8	2,25	1,736	9,436	0,028	0,105	1,709	24,90	0,115	0,5144368
18	9	2,15	1,788	9,063	0,027	0,101	1,761	27,58	0,104	0,1384787
19	10	2,05	1,847	8,681	0,026	0,098	1,821	30,15	0,093	0,7783861
20	11	1,95	1,914	8,296	0,025	0,094	1,888	32,61	0,083	4,43425262
21	12	1,85	1,990	7,912	0,023	0,091	1,963	34,96	0,073	3,10695095
22	13	1,75	2,076	7,536	0,022	0,088	2,050	37,19	0,064	2,7938168
23	14	1,65	2,174	7,172	0,021	0,085	2,148	39,31	0,055	4,0596284
24	15	1,55	2,287	6,826	0,020	0,082	2,261	41,34	0,046	3,1281027
25	16	1,45	2,417	6,504	0,019	0,079	2,391	43,26	0,038	3,8320256
26	17	1,35	2,568	6,211	0,018	0,077	2,541	45,10	0,031	6,8539146
27	18	1,25	2,744	5,955	0,018	0,074	2,717	46,87	0,023	4,4383987
28	19	1,15	2,954	5,743	0,017	0,072	2,925	48,57	0,016	7,2001588
29	20	1,05	3,204	5,587	0,017	0,070	3,174	50,23	0,009	3,9884171
30										
31	Gesamtvolumen		100,5	[L]						
33	Gesamt Vol. Prod		8,48	[mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						
34			747	[mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹]						

Berechnung der Spalten:

- Höhe (Spalte A)
- Druck (Spalte B)
- α-Begasungsrate (Spalte C)
- ω-Begasungsrate (Spalte G)
- Vol. Produktivität (Spalte D)

Höhe der Blasensäule vom Blasensäulenboden gerechnet, bestimmt über die Flüssigkeitssäule von Wasser den Druck
 Druck auf mittlerer Höhe des Höheninkrements
 Begasungsrate entspricht der über die Druckänderung expandierter Begasungsrate des vorherigen Höheninkrements
 Begasungsrate nach Abnahme durch den Stofftransport Butan+Sauerstoff ins Medium, Berechnet über die Ausbeute
 Berechnet mit der Formel auf Basis der Charakterisierung für Begasungsrate, Temperatur, Druck und Butangehalt

$$Vol. Prod. [mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}] = [3,47 \cdot \dot{V} + 1,25 + (p_i - 1,1) \cdot (-0,558 \cdot y_{Bu,0} + 13,117) + (T - 30) \cdot 0,22] \cdot \left(\frac{y_{Bu,i}}{y_{Bu,0}} \right) \cdot 0,7$$

Begasungsrate: \dot{V} aus C1
 Mittlerer Druck im Höhenelement: p_i aus Spalte B
 Initialgehalt an Butan im Gasstrom bestimmt die Steigung der vol. Produktivität bei Druckerhöhung
 Temperatur T
 Butangehalt im jeweiligen Höhenelement (Spalte F) - Skalierung der vol. Produktivität auf Grund der Verringerung des Konzentrationsgradienten
 Skalierungswert aus Versuch mit 95 cm Höhe

- Teilausbeute (Spalte E)
- Butananteil (Spalte F)
- Aufsummierte Ausbeute (Spalte G)
- Sauerstoffanteil
- Gesamt Vol. Produktivität (C34)

Berechnet die Ausbeute im jeweiligen Höheninkrement über die vol. Produktivität und den zugeführten Butanstrom
 Berechnet mit der volumetrischen Produktivität wie viel Restbutananteil im Gasstrom vorhanden ist.
 Begasungsrate am Ende des Höheninkrements durch die Abnahme des Partialdrucks von Butan und Sauerstoff
 Berechnet den verbleibenden Sauerstoffanteil im Gas wenn dieser 3:1 mit jedem Butanmolekül abreagiert.
 Mittelwert aller Vol. Produktivitäten aus Spalte D

Anhang 28 : Stöchiometrie Butan-Sauerstoff 1:3 bei der Skalierungsabschätzung und Einordnung in den Explosionsbereich; Rot: unterhalb OEG; Grün oberhalb OEG.

Gesamtausbeute in 20 Meter Blasensäule mit 80 mm Durchmesser bei 35°C							
Butangehalt [% v/v]	Begasungsrate [L·min ⁻¹]						
	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	
14	82.1	63.0	53.4	47.9	44.3	41.8	
16	77.5	57.9	48.6	43.3	40.0	37.6	
18	73.1	53.4	44.5	39.5	36.4	34.2	
20	69.1	49.6	41.1	36.3	33.4	31.3	
minimaler Sauerstoffanteil aus Stöchiometrie [% v/v]							
14 % v/v Butan	36%	28%	24%	21%	20%	19%	
16 % v/v Butan	39%	30%	25%	22%	20%	19%	
18 % v/v Butan	42%	31%	26%	23%	21%	20%	
20 % v/v Butan	42%	30%	26%	22%	20%	19%	
Unter OEG	Über OEG						

Anhang 29 : Übersicht k_{La} -Messungen

k_{La} & Gasgehalt Messungen							
Flüssigkeitslevel ohne Begasung:		402	[mm]		Datum:	26.06.2018	
Messungs#	Temperatur	Druck	Begasungsrate	ΔH	Leerrohrgeschwindigkeit	k_{La}	
[-]	[°C]	[mbar]	[L·min ⁻¹]	[mm]	[cm·s ⁻¹]	[h ⁻¹]	
43	30	100	0.5	8	1.7	54.4	
44			1	7	3.3	69.9	
45			1.25	12	4.1	73.4	
46			1.5	9	5.0	80.3	
47			0.7	5	2.3	59.8	
48			0.25	16	0.8	39.9	
49			1.5	10	5.0	78.2	
50			0.5	10	1.7	49.2	
51			1.25	15	4.1	70.0	
52			0.7	17	2.3	58.4	
53			0.25	20	0.8	37.7	
54			1	13	3.3	66.0	
55			0.5	5	1.7	49.3	
56			1.25	20	4.1	66.4	
57			0.25	10	0.8	38.9	
58			1	18	3.3	72.2	
59			1.5	13	5.0	72.5	
60			0.7	5	2.3	59.3	
61			300	0.7	16	2.3	61.4
62				0.7	10	2.3	60.6
63	0.7	18		2.3	56.2		
64	500	0.7	5	2.3	62.9		
65		0.7	16	2.3	59.7		
66		0.7	13	2.3	52.2		
67	35	100	1.5	14	5.0	81.7	
68			0.7	14	2.3	66.8	
69			1.25	14	4.1	72.1	
70			0.25	14	0.8	40.0	
71			0.7	14	2.3	62.0	
72			0.5	14	1.7	57.7	
73			1	23	3.3	69.1	
74			0.7	14	2.3	57.6	
75	40	100	1.25	5	4.1	82.9	
76			0.7	14	2.3	65.9	
77			1	11	3.3	76.5	
78			0.7	17	2.3	73.6	
79			0.25	14	0.8	47.4	
80			0.7	17	2.3	72.4	
81			1.5	14	5.0	81.8	
82			0.5	5.5	1.7	61.5	

Anhang 30 : HZD - Salzlösung

Name	Komponente	Konzentration [g·L ⁻¹]	Konzentration [mmol·L ⁻¹]
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.6	27.2
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	38.2	219.3
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	25	183.7
Hefeextrakt	--	13.4	--
Natriumcitrat	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ *2H ₂ O	4.6	17.8

Anhang 31 : Preparationsvorschrift HZD-Medium

Medium	Komponente	Konzentration [ml·L ⁻¹]
HZD-Salzlösung	siehe Anhang 30	920
Ammonium-iron (III) citrate	NH ₄ Fe C ₆ H ₅ O ₇	17
HCD-Feed	Siehe Anhang 32	30
Glukose	Glucose stock (500 g/kg)	20
Spurenelemente Stammlsg.	See Anhang 34	15
Antibiotics	Kanamycin (50g/L)	1

Anhang 32 : Preparationsvorschrift HZD-Feed

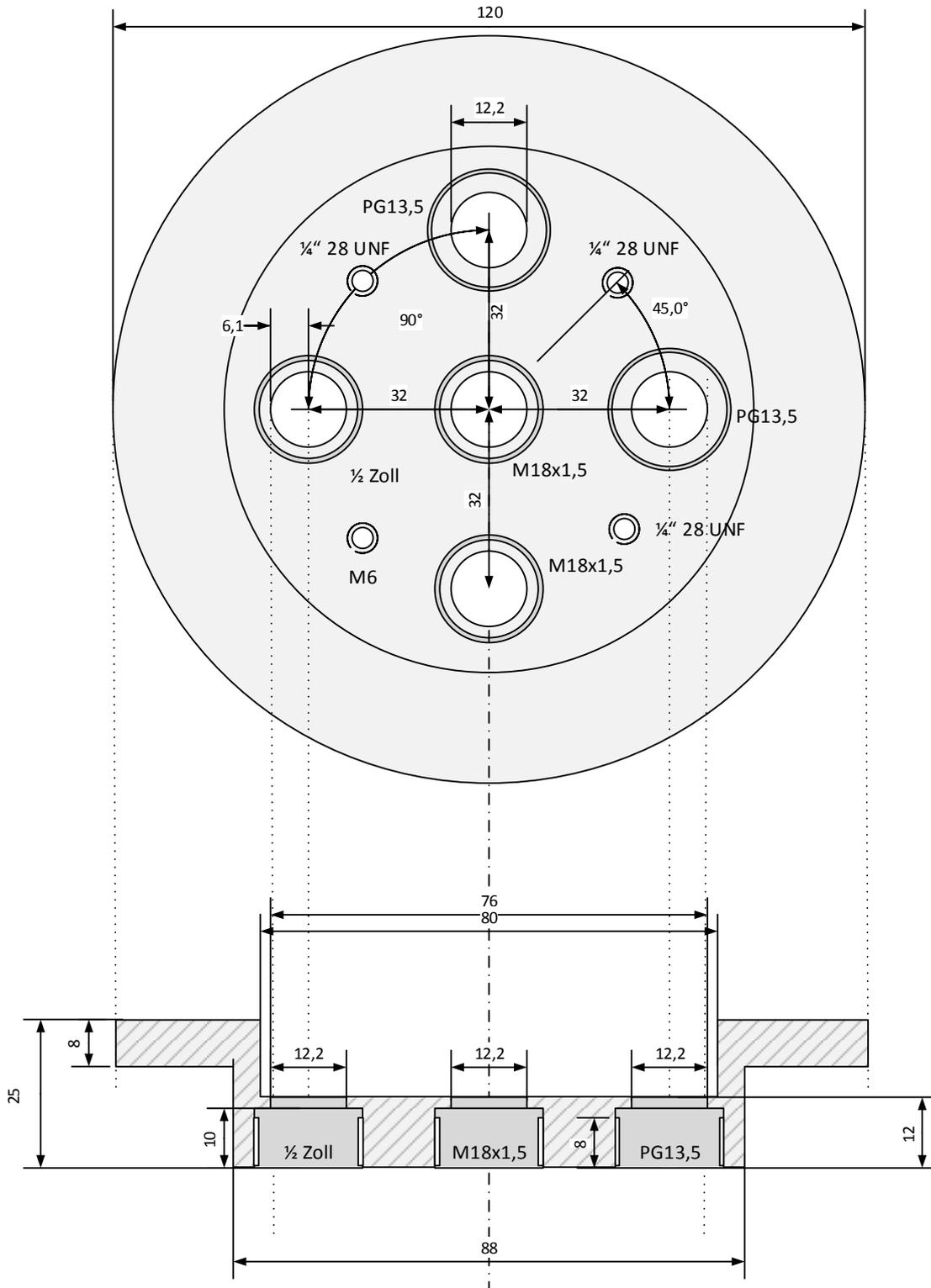
Name	Komponente	Konzentration [ml·L ⁻¹]
HZD Feed Glukose Stammlsg.	Glukose (500 g·Kg ⁻¹)	850
Magnesiumsulfat Stammlsg.	MgSO ₄ *7H ₂ O (200 g/kg)	50
Ammoniumchlorid Stammlsg.	NH ₄ Cl	100

Anhang 33 : Preparationsvorschrift M9-Medium

Name	Komponente	Konzentration [g·L ⁻¹]	Konzentration [mmol·L ⁻¹]
Dinatriumphosphat	Na ₂ HPO ₄	6.79	47.8
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	3	22.0
Natriumchlorid	NaCl	0.50	8.6
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	2	37.4

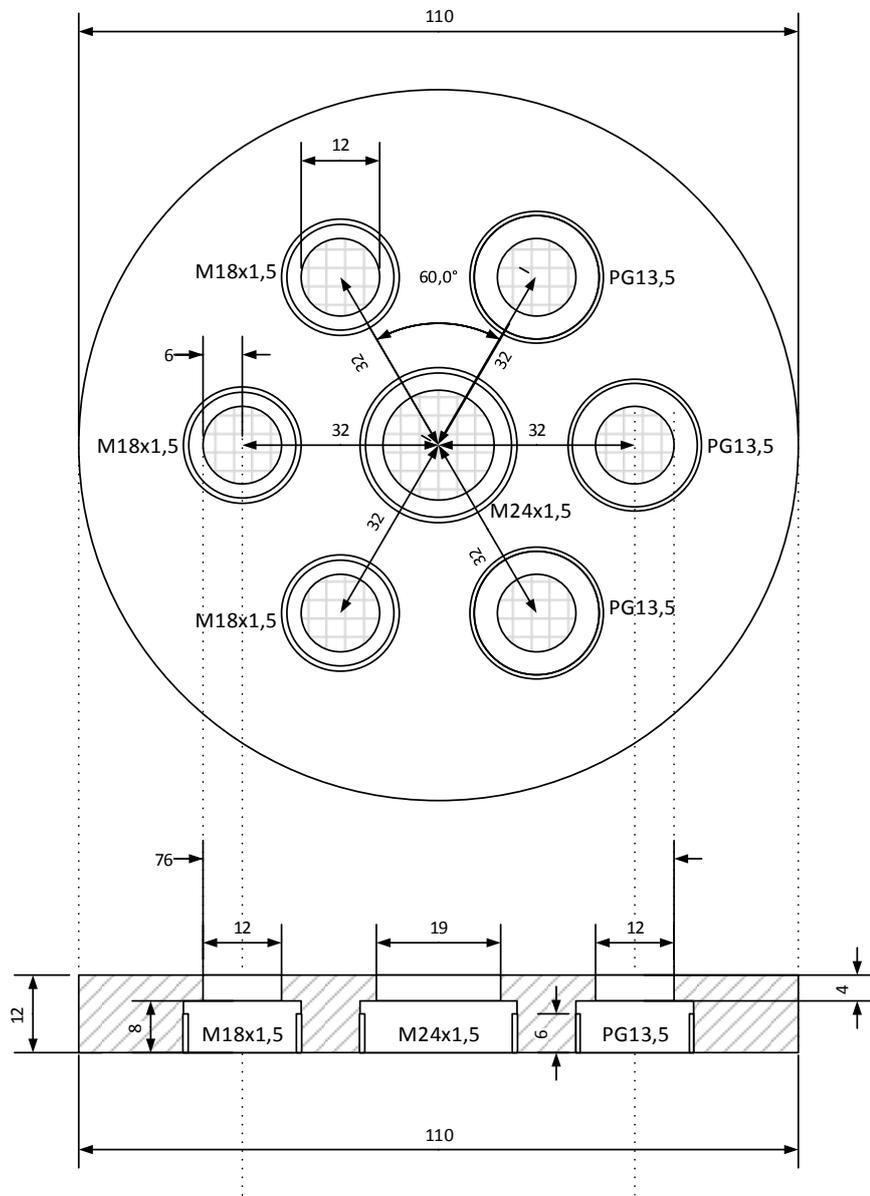
Anhang 34 : Preparationsvorschrift Spurenelemente-Stammlösung

Name	Komponente	Konzentration [g·L ⁻¹]	Konzentration [mmol·L ⁻¹]
Salzsäure 37 %	HCl	36.5	370
Mangan(II)-chlorid	MnCl ₂ *4H ₂ O	1.91	15.2
Zinc sulfate	ZnSO ₄ *7H ₂ O	1.87	11.6
Triplex III	Na-EDTA*2H ₂ O	0.84	2.3
Borsäure	H ₃ BO ₃	0.3	4.9
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25	1.2
Calciumchlorid	CaCl ₂ *2H ₂ O	4.7	42.3
Eisen(II)-sulfat	FeSO ₄ *7H ₂ O	17.8	117.2
Kupfer(II)-chlorid	CuCl ₂ *2H ₂ O	0.15	1.1



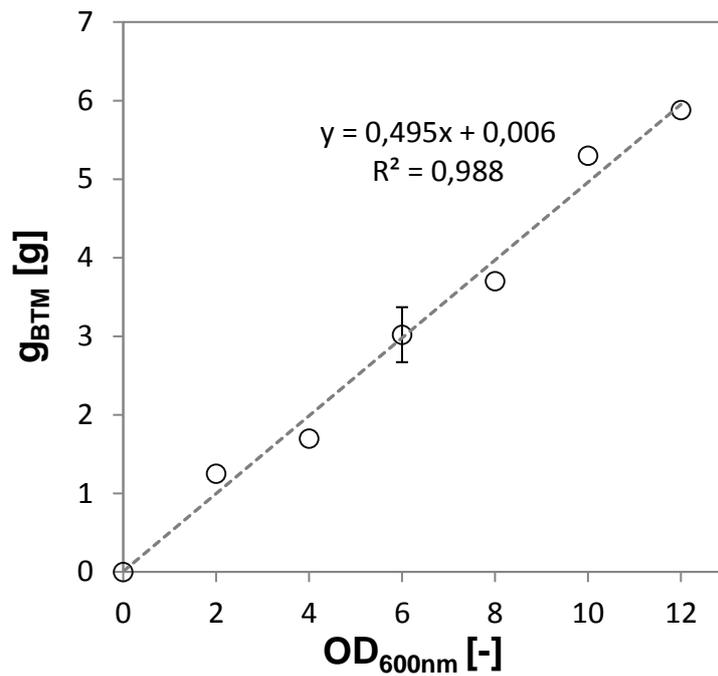
Blasensäulen – Bodenflansch 1.4301

Anhang 36 : Konstruktionszeichnung Deckelplatte für Blasensäule (Maßangaben in Millimeter)

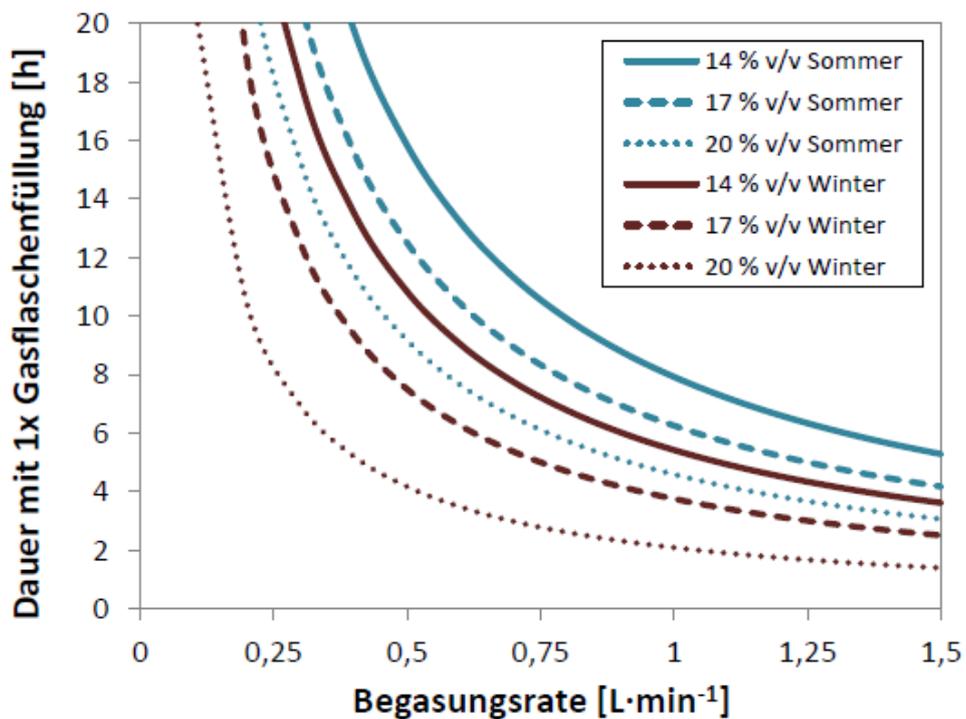


Reaktorkopfplatte 1.4301

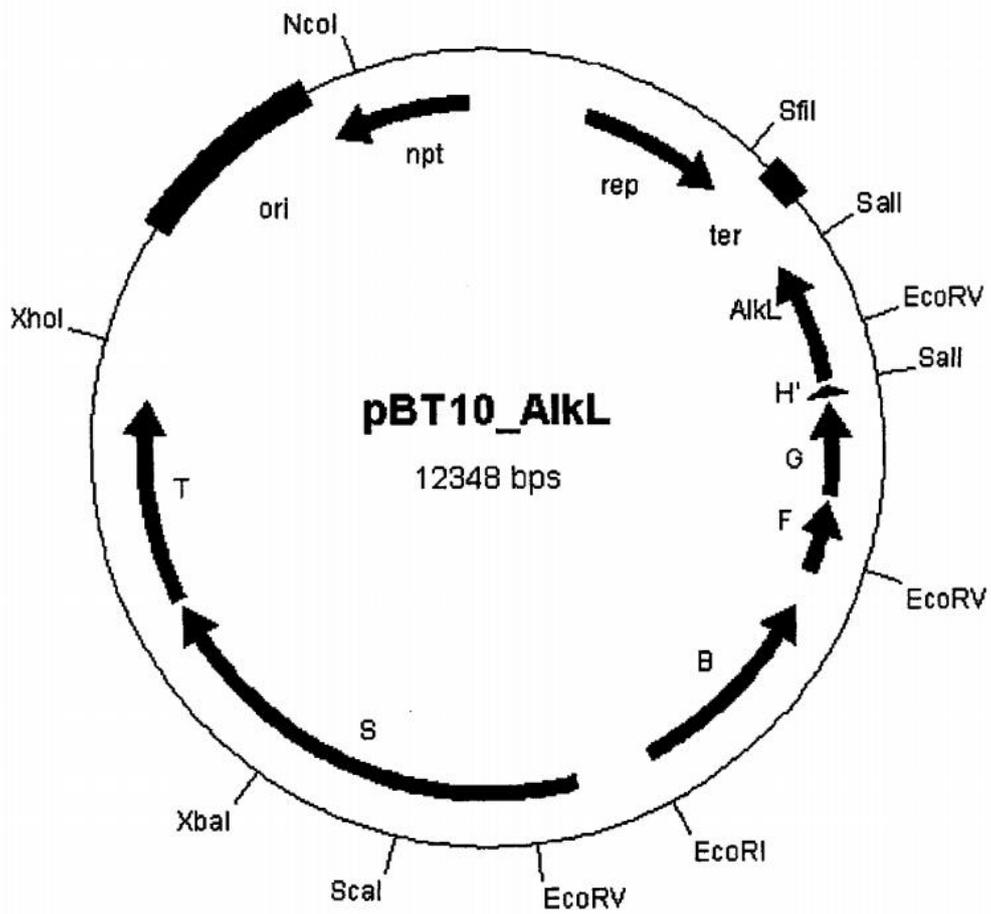
Anhang 37 : Verhältnis optische Dichte (OD600nm) zu Zelltrockenmasse (BTM : Biotrockenmasse)



Anhang 38: Gasflaschenausdauer 50 Liter bei verschiedenen Begasungsraten und Butangehalten; Unterschied zwischen Sommer (+10°C) und Winter (-10°C) -Füllungen; Sommer: 14 % v/v = 11 bar; 17 % v/v = 9 bar; 20 % v/v = 7 bar; Winter: 14 % v/v = 8 bar; 17 % v/v = 6 bar; 20 % v/v = 4 bar; alle Druckangaben sind absolut.



Anhang 39 : Plasmidkarte von pBT10 mit den codierenden Bereichen für Alk B, Alk G und Alk T. Karte aus US-Patent: US9200043B2 [58]



Diese Dissertation ist zu finden unter:

<https://doi.org/10.15480/882.2384>